

**Regulació postraduccional per SUMO i la
seva funció en respostes a estrès a
*Arabidopsis thaliana***

José Seguí Borrell

Barcelona, 2009

Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia
Departament de Biologia i Bioquímica Molecular
Programa de doctorat de Biotecnologia, Bienni 2005-2007



Regulació postraducciona per SUMO i la seva funció en respostes a estrès a *Arabidopsis thaliana*

Memòria presentada per José Seguí Borrell llicenciat en Biologia per
optar al grau de doctor per la Universitat de Barcelona

Aquest treball, realitzat al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona i al Departament de Genètica Molecular Vegetal del Centre de Recerca en Agrigenòmica Crag, ha estat finançat pel Ministeri d'Educació i Ciència amb la beca predoctoral per a la formació de personal investigador BES-2005-6843

La directora de la tesi

la tutora

l'autor

Dra. L. Maria Lois Rojas

Dra. Montserrat Busquets

José Seguí Borrell

Als meus pares

AGRAÏMENTS

Poder fer una tesi per mi ha estat per mi una gran sort, és un somni fet realitat. Per això vull agrair a tots els que m'han ajudat en aquest camí.

En primer lloc vull agrair a Mari Lois el fet de donar-me l'oportunitat de fer la tesi sota la seva direcció i haver-me obert les portes del coneixement científic. Et vull agrair que m'escollissis com al teu primer becari i poder desenvolupar tot aquest treball. Gràcies per la paciència que has tingut amb mi en tot aquest camí, no sempre fàcil.

També vull agrair el suport incondicional a Maribel, no deixant-me caure mai i sempre animant-me a anar cap endavant. Has estat present en l'època final de la tesi, la més dura, en la que necessitava més ajut i sempre t'he tingut al meu costat. Gràcies per tota la paciència que has tingut, per aguantar tots aquells assajos de seminari en els quals entenies poc però m'ajudaves a perfeccionar l'estil. Aguantar tots els alts i baixos que he anat tenint i fer-me veure sempre el costat positiu de les coses. Gràcies xiqueta per ser com eres, no canviïs mai!

Gràcies a tots els membres de lab "SUMOs", la veritat és que sou tots uns molt bons companys. Hem anat creixent poc a poc i ara som l'enveja de tot el CSIC com a grup, jaja. Vam començar Natalia i jo amb la mudança, buff! Quins dies passàvem, totes les hores junts, aguantant-nos penes i alegries, és que en el fons eres com una germana. Més tard, amb les noves incorporacions, ens hem adaptat tots molt bé a la convivència al laboratori. Inês i Laura, segur que surt una supertesi del vostre treball, sou unes cracks! Gràcies a les dos sobretot per l'ajuda en aquest tram final on no tenia temps ni per respirar i sempre estàveu disposades a donar-me un cop de mà. Gràcies a Rubén, quantes llavors has recollit i quantes plantes has sembrat... Part d'aquest treball és teu. Gràcies per la feina i per les estones que hem passat junts. També agrair al Félix tot el seu suport i experiència en l'escriptura científica, per tots els consells. Muchos ánimos y paciencia en este laboratorio, cuida de las chicas, eh?!

Fer menció especial a Irma. Encara que no t'ho creguis, m'has fet madurar moltíssim com a científic. Quan vas venir a treballar, se'm va obrir el cel, portava tres anys treballant sol al grup i la teva arribada em va aportar llum, idees i sobretot molts ànims per desenvolupar la tesi. Sempre al meu costat i disposada a ajudar-me en tot el que poguessis. Segur que la teva carrera científica serà brillant, ànims que tu ho vals!! Ens veiem ara després.

Als xavals de la UB, quants callejeros, quantes estones a la barana, quants partits de futbol al "neng", quines risses. Etapa inoblidable, l'ambient era fantàstic. Sempre recordaré els dinars als menjadors on es parlava de tot, hi havia dies on arreglàvem el món, altres on érem els millors entrenadors de futbol del món, quines tertúlies. Gràcies a tots, Pedro, Albert, Sergi, Vicente, Victor, Francesc, Edu. Molta sort en tesis, postdocs, feines i demés. Més tard va arribar el descobriment per a mi de Jose C. Paz, com m'has fet riure, mucha suerte compadre. Amb tots els xavals els dies eren més agradables i es feia més fàcil anar cap endavant. Gràcies Albert per tots els consells dintre i fora del laboratori, tu sí que llegiràs una tesi de «campeón». Tu també Victor, la teva tesi té un mèrit incalculable, ànim que ja ho tens. Quins records allà dalt al camp de futbol, quin equipàs. Perdre per menys de 3 gols era una victòria. També agrair a Maxime i a Karel la seva amabilitat i les estones divertides que m'han fet passar a la UB. To Irini for all the advices that you gave me. Moreover, my English improved a little after your arrival. Mencionar en aquest grup de GMP a Rocco. En els meus inicis al lab, de seguida em va acollir com un amic i vam compartir moltíssimes coses, dins i fora del lab. Moltes gràcies Rocco.

Al grup de Manuel. Sempre us hem tingut com a veïns i sempre ajudant-nos. Gràcies Manuel per tots els consells i les teves preguntes als seminaris on em feies veure aspectes de la meva feina que em feien madurar. Gràcies a tots els membres del teu grup. Primer convivint al laboratori de la UB, Eva, Patri, Úrsula, Susana, Ana. Agrair a Antía totes les vivències junts, els viatges junt amb Francesc, els cafès de "quiero hablar un rato contigo", per mostrar-me la teva terra... no pararia mai, hi ha tantes coses. Ànims amb la tesi, tindràs un treball maquíssim amb tot el que has treballat. Gràcies

Heavy per totes les estones que hem passat junts, tota l'ajuda científica i artística fent fistros i no tan fistros. També agrair a totes les incorporacions del grup MRC ja al CSIC per tota l'ajuda situant-nos a la sisena planta, Pablo (suerte en tu "postdó"), Mike, Gabi, Catalina i Àguila (la niña con más "grasia" de la sexta planta).

I al lila lab al complet. A Jaume per tots els consells científics i a Marçal, Mercè, Anahit, Nico, Jordi per fer més agradable els llargs dies al CSIC i a les campanes dels hivernacles. Enhorabona Jaume, crec que tens un grup de gent molt maco.

Als amics del meu poble i d'aquí de Barcelona, encara que això de la ciència els queda una mica lluny, sempre es preocupaven per com m'anava. Ells feien que desconnectés de la ciència i gaudís de moltes altres coses.

I gràcies a la meva família. Als meus pares que a pesar d'estar una mica lluny, sempre m'han ajudat i és com si els hagués tingut vivint a la porta del costat. Gràcies per donar-me la millor educació possible i poder fer que jo arribés onestic. També agrair a la meva germana la seva tendresa, el seu suport i la seva fe en mi. Gràcies filòsofa! Als meus tiets, Paco i Tere, i els meus cosins, Scarlett i Alvar, pel seu suport i el seu interès per la meva feina. A la meva família que està per aquí a Barcelona, Maribel, Rafa, Lluís i Amparo, sempre donant-me ànims i ajudant-me a desconnectar. Especialment a la meva tieta, que em va acollir a sa casa com si fos un fill.

Gràcies a tots!!

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1 Polipèptids com a modificació postraduccional	3
2 La Sumoilació com a modificació	4
3 Estructura de SUMO i isoformes	4
4 La maquinària de conjugació de SUMO a <i>Arabidopsis</i>	8
4.1 Enzim activador de SUMO (SAE)	10
4.2 Enzim conjugador de SUMO (SCE)	12
4.3 Lligases de SUMO	13
4.4 Proteases de SUMO	15
5 Especificitat de substrat en la sumoilació	16
6 Substrats i funcions de la modificació per SUMO	18
2. OBJECTIUS	23
3. RESULTATS	27
Capítol I. Caracterització dels components de sumoilació	29
1 Estudi del patró d'expressió gènica dels components del sistema de sumoilació	29
1.1 Expressió de la maquinària de sumoilació	29
1.2 Patró d'expressió de les isoformes de la subunitat petita de l'enzim activador	31
2 Estudis d'homologia de l'enzim activador (E1). Estructures primària i terciària.	33
3 Localització subcel·lular de l'enzim activador (E1)	36
4 Caracterització <i>in vitro</i> dels components del sistema de sumoilació	38
4.1 Anàlisi de l'expressió i estabilitat AtE1 en <i>Escherichia coli</i>	39
4.2 Anàlisi de l'estabilitat de AtE1 <i>in vitro</i> . Desnaturalització induïda per temperatura	40

4.3	Assaig de sumoilació <i>in vitro</i>	41
4.3.1	Expressió i purificació dels diferents components del sistema de sumoilació.....	42
4.3.2	Validació de GST-CAT com a substrat específic de SUMO	43
4.3.3	Anàlisi cinètic de la maquinària de sumoilació. Assaig de sumoilació <i>in vitro</i>	45
5	Caracterització de la interacció no covalent AtSUMO-AtSCE	47
5.1	Interacció no covalent E2-SUMO. Assaig de doble híbrid	48
5.2	Model d'estructura d'interacció no covalent AtSCE-AtSUMO	49
 Capítol II. Estudi de la sumoilació com un mecanisme regulador essencial a <i>Arabidopsis</i>		50
1	Caracterització de plantes mutants de la maquinària de sumoilació	50
1.1.	Anàlisi de les plantes mutants <i>atsae1a.3</i>	52
2	El domini E1 Ubl és essencial per a la conjugació de SUMO	54
2.1	Expressió i purificació de AtE1ΔUbl	54
2.2	Assaig sumoilació <i>in vitro</i> amb AtE1ΔUbl	55
3	Estratègia per reduir els nivells de sumoilació a plantes: Expressió del domini AtE1 Ubl	56
3.1	Validació de l'estratègia	57
3.1.1	Interacció entre el domini AtE1 Ubl i l'enzim AtSCE1. Expressió transitòria CFP-AtE2 i YFP-Ubl	57
3.1.2	El domini AtE1 Ubl disminueix l'eficiència de la sumoilació <i>in vitro</i>	59
3.2	Plantes transgèniques expressores del domini AtE1 Ubl	61
3.2.1	Caracterització fenotípica i molecular de les plantes transgèniques	62
3.2.2	Anàlisi de la resposta de les plantes transgèniques a situacions d'estrès abiòtic	64

4. DISCUSSIÓ	67
1. El sistema de sumoilació a <i>Arabidopsis</i> . Isoformes de SUMO	69
2. L'enzim activador de SUMO a <i>Arabidopsis</i>	74
3. Interacció no covalent AtSUMO-AtSCE	78
4. La sumoilació és essencial a <i>Arabidopsis</i> . Plantes expressores del domini AtE1 Ubl	82
5. CONCLUSIONS	87
6. MATERIALS I MÈTODES	91
1 Material biològic	93
1.1 Material bacterià	93
1.1.1. Soques bacterianes	93
1.1.2. Obtenció de cèl·lules competents per xoc tèrmic	94
1.1.3. Obtenció de cèl·lules electrocompetents	94
1.1.4. Medis de cultiu bacterians	95
1.1.5. Suplements dels medis de cultiu bacterians	96
1.1.6. Condicions de cultiu de bacteris	96
1.2. Material vegetal	97
1.2.1. Ecotip silvestre	97
1.2.2. Línies transgèniques	97
1.2.3 Línies mutants d'inserció de T-DNA	97
1.2.4. Condicions de cultiu a l'hivernacle	97
1.2.5 Medis de cultiu de plantes	98
1.2.6. Suplements dels medis de cultiu de plantes	98
1.2.7 Condicions de cultiu <i>in vitro</i>	98
1.3 Llevat	99
1.3.1. Soques de llevat	99
1.3.2. Obtenció i transformació de cèl·lules competents per xoc tèrmic	99

1.3.3.	Medis de cultiu de llevat	100
1.3.4.	Condicions de cultiu de bacteris	101
1.4	Plasmidis	101
1.4.1	Vectors	101
1.4.1.1	Vectors de clonatge de productes de PCR	101
1.4.1.2	Vectors d'expressió en <i>E.coli</i>	101
1.4.1.3	Vectors de transformació plantes	102
1.4.1.4	Vectors assaig doble híbrid de llevat	102
1.4.2	Construccions	102
1.5	Encebadors	105
2	Metodologies	107
2.1	Tècniques de biologia molecular dels àcids nucleics	107
2.1.1	Obtenció de DNA plasmídic	107
2.1.2	Subclonatge de fragments de DNA en vectors	107
2.1.2.1	Reaccions de modificació del DNA	107
2.1.2.2	Transformació de cèl·lules competents d' <i>E.coli</i> per xoc tèrmic	107
2.1.2.3	Transformació de cèl·lules competents d' <i>A. tumefaciens</i> per electroporació	108
2.1.3	Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	109
2.1.3.1	Retrotranscripció	109
2.1.3.2	Amplificació per PCR	110
2.1.3.3	Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR	112
2.1.4	Separació de DNA en gels d'agarosa	112
2.1.5	Seqüenciació del DNA	112
2.1.6	Purificació de fragments de DNA	113
2.1.7	Mutagènesi dirigida per PCR	114
2.1.8	Obtenció de RNA total d' <i>Arabidopsis</i>	114
2.1.9	Quantificació d'àcids nucleics	114
2.1.10	Anàlisi de l'RNA per northern-blot	115
2.1.11	Obtenció de sondes de DNA i marcatge radioactiu	116
2.1.11.1	Generació de sondes de DNA	116

2.1.11.2	Marcatge radioactiu de fragments de DNA per <i>random priming</i>	.117
2.1.12	Hibridació de membranes northern-blot amb sondes de DNA117
2.2	Tècniques de biologia molecular de proteïnes118
2.2.1	Obtenció d'extractes proteics118
2.2.2	Quantificació de proteïnes118
2.2.3	Separació electroforètica de proteïnes119
2.2.4	Anàlisi de proteïnes per transferència i immunodetecció (<i>Western-blot</i>)120
2.2.4.1	Anticossos utilitzats121
2.2.4.2	Tinció de proteïnes121
2.2.5	Expressió heteròloga de proteïnes a <i>E.coli</i>122
2.2.6	Purificació de proteïnes123
2.2.7	Desnaturalització de proteïnes induïda per calor124
2.2.8	Assaig de sumoilació in vitro125
2.3	Mètodes de plantes125
2.3.1	Esterilització de llavors125
2.3.2	Sembra de llavors125
2.3.3	Obtenció de plantes transgèniques. Transformació de plantes d' <i>Arabidopsis</i>127
2.3.4	Anàlisi molecular de les plantes mutants128
2.3.4.1	Obtenció de DNA genòmic de planta128
2.3.4.2	Comprovació del genotip per PCR129
2.3.5	Tractaments d'estrès129
2.3.6	Mesura mida roseta130
2.3.7	Microbombardeig130
2.3.7.1.	Observació de les mostres microbombardejades132
2.4	Assaig doble híbrid de llevat133
3	Bioinformàtica133
7.	BIBLIOGRAFIA135

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

INTRODUCCIÓ

Taula 1.	Components de la maquinària de sumoilació a <i>Arabidopsis</i> .	7
Figura 1.	Diagrama en cintes remarcant la similitud de l'estructura tridimensional de la ubiquitina i el SUMO1 humà.	5
Figura 2.	Comparació de les seqüències dels ortòlegs de SUMO a <i>Arabidopsis</i> .	8
Figura 3.	El cicle de sumoilació i desumoilació a <i>Arabidopsis</i> .	10
Figura 4.	La xarxa de connexions de la via de sumoilació.	19

RESULTATS

Figura 5.	Nivells d'expressió dels diferents components del sistema de sumoilació a diferents teixits d' <i>A. thaliana</i> i diferents estadis de desenvolupament.	30
Figura 6.	Nivells d'expressió de mRNA que codifiquen per les dues isoformes de la subunitat petita de l'enzim activador.	31
Figura 7.	Patró d'expressió de les dues isoformes de la subunitat petita de l'enzim activador (<i>AtSAE1</i>) segons la base de dades BAR.	32
Figura 8.	Alineament de les seqüències aminoacídiques de les isoformes de l'enzim activador (E1) d' <i>A. thaliana</i> i el seu ortòleg humà.	34
Figura 9.	Predicció de l'estructura de l'enzim activador de SUMO.	35
Figura 10.	Esquema de les construccions de <i>AtSAE2</i> emprades a l'experiment d'expressió transitòria.	36
Figura 11.	Localització subcel·lular d' <i>AtE1</i> .	38
Figura 12.	Expressió heteròloga de les diferents subunitats de <i>AtE1</i> a diferents temperatures.	40
Figura 13.	Desnaturalització induïda per temperatura monitoritzada per calorimetria diferencial de rastreig de les dues isoformes de l'enzim activador de SUMO d' <i>A. thaliana</i> .	41
Figura 14.	Components dels assajos de sumoilació <i>in vitro</i> purificats.	43
Figura 15.	Substrat de SUMO GST-CAT K419A.	44
Figura 16.	Assaig de sumoilació <i>in vitro</i> .	44
Figura 17.	Assaig de sumoilació <i>in vitro</i> amb isoformes de <i>AtE1/b</i> .	45

Figura 18.	Assaig de sumoilació <i>in vitro</i> amb isoformes de AtSUMO.	46
Figura 19.	Assaig de doble híbrid amb isoformes AtSUMO 1, 2, 3 i 5, HsSUMO1 i AtUB1 amb AtSCE1 i AtUBC10.	48
Figura 20.	Model d'estructura de la interacció entre SUMO i el seu enzim conjugador.	49
Figura 21.	Mutants d'inserció de T-DNA de la maquinària de sumoilació.	51
Figura 22.	Anàlisi molecular dels mutants de la maquinària de sumoilació.	52
Figura 23.	Nivells de sumoilació en plantes <i>atsae1a.3</i> mutants sotmeses a estrès tèrmic.	53
Figura 24.	Nivells de sumoilació en plantes <i>atsae1a.3</i> mutants sotmeses a estrès hídric.	54
Figura 25.	Purificació de AtE1ΔUbl resolta en cromatografia SDS-PAGE.	55
Figura 26.	Assaig de sumoilació <i>in vitro</i> amb AtE1ΔUbl.	56
Figura 27.	Esquema de les interaccions del dominant negatiu.	57
Figura 28.	Localització subcel·lular de AtSCE1 i del domini Ubl de AtE1.	59
Figura 29.	Purificació del domini Ubl+Ct resolta en cromatografia SDS-PAGE.	60
Figura 30.	Assaig de sumoilació <i>in vitro</i> amb la presència del domini Ubl.	61
Figura 31.	Anàlisi fenotípic de les plantes transgèniques.	63
Figura 32.	Anàlisi fenotípic de les noves línies de plantes transgèniques.	64
Figura 33.	Nivells de sumoilació en plantes sotmeses a estrès hídric.	65

MATERIALS I MÈTODES

Taula M.I.	Suplements utilitzats en el treball amb els bacteris <i>E.coli</i> i <i>A.tumefaciens</i> i amb plantes d' <i>A.thaliana</i> .	96
Taula M.II.	Construccions emprades en aquest treball.	102
Taula M.III.	Encebadors utilitzats en aquest treball.	105
Taula M.IV.	Sondes radioactives utilitzades en aquest treball.	116
Figura M.I.	Representació esquemàtica de la mutagènesi dirigida basada en la PCR.	114
Figura M.II.	Representació esquemàtica del sistema de biolística.	132

ABREVIATURES I SÍMBOLS

%	tant per cent	mA	miliamperes
A	adenina	mg	milígrams
ABA	àcid abscísic	min	minuts
Amp	ampicil·lina	mL	mililitres
Amp^r	resistència a ampicil·lina	MOPS	àcid 2-(N-morfolín) etansulfònic
BASTA	bialaphos	mRNA	RNA missatger
C	citosina	mV	milivolts
Cb	carbenicil·lina	ng	nanograms
cDNA	DNA complementari	nm	nanòmetres
Cf	cefotaxima	Nt	amino terminal
CFP	proteïna fluorescent blava	O/N	tota la nit
cpm	comptes per minut	p/v	relació pes/volum
Ct	carboxi terminal	PPT	phosphinothricin
D.O.	densitat òptica	Rf	rifampicina
DMSO	dimetil sulfòxid	RNA	àcid ribonucleic
DNA	àcid desoxirribonucleic	rpm	revolucions per minut
dNTP	desoxirribonucleotid	RT-PCR	Retrotranscripció per PCR
DTT	dithiothreitol	Sae1	subunitat petita de l'enzim activador de SUMO
E1	enzim activador de SUMO	Sae2	subunitat gran de l'enzim activador de SUMO
E2	enzim conjugador de SUMO	Sce1	enzim conjugador de SUMO
E3	enzim lligasa de SUMO	SD	dia curt
EDTA	ácido etilendiaminotetraacètic	SUMO	Small Ubiquitin-like MODifier
g	força centrífuga relativa (RCF)	T	timana
g	grams	TA	temperatura ambient
G	guanina	T-DNA	DNA transferit
h	hores	Ub	Ubiquitina
Hyg	higromicina	Ubc9	enzim conjugador de SUMO a <i>S. cerevisiae</i> i <i>H. sapiens</i>
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactòsid	V	volts
Kan^r	resistència a kanamicina	v/v	relació volum/volum
kb	kilobase	W	watts
kDa	kilodalton	X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosid
kV	kilovolt	YFP	proteïna fluorescent groga
L	litre	μg	microgram
LD	dia llarg	μl	microlitres

En les seqüències aminoacídiques:

A	Ala, Alanina	G	Gly, Glicina	M	Met, Metionina	S	Ser, Serina
C	Cys, Cisteïna	H	His, Histidina	N	Asn, Asparragina	T	Thr, Treonina
D	Asp, àcid aspàrtic	I	Ile, Isoleucina	P	Pro, Prolina	V	Val, Valina
E	Glu, àcid glutàmic	K	Lys, Lisina	Q	Gln, Glutamina	W	Trp, Triptòfan
F	Phe, fenilalanina	L	Leu, Leucina	R	Arg, Arginina	Y	Tyr, Tirosina

1. INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1 Polipèptids com a modificació postraduccional

Tots els organismes utilitzen una varietat de modificadors químics per al control postraduccional de l'activitat proteica que afecten el desenvolupament, el creixement i la homeòstasi. En aquests casos, molècules com el metà, l'acetat, àcids grassos, sucres, nucleòsids o grups fosfat són units a residus específics d'aminoàcids de proteïnes diana. A més d'aquestes molècules, les cèl·lules eucariotes utilitzen polipèptids com a modificació postraduccional. La ubiquitina va ser el primer pèptid en ser descrit que s'uneix covalentment a d'altres proteïnes després de finalitzar aquestes la seva síntesi. Aquest concepte d'unió covalent entre un polipèptid i altre va ser descrit l'any 1980 per Herskho, Ciechanover, Rose i col·laboradors (Herskho i Ciechanover 1998). Aquests investigadors observaren que la conjugació de la proteïna de mida petita ubiquitina (ubiquitinació) té un paper ben establert en la destinació de proteïnes a la degradació via el proteosoma 26S. En els últims anys, nombrosos estudis han posat de manifest la gran rellevància dels polipèptids com a modificadors postraduccional a l'hora de regular diversos processos cel·lulars. El més conegut és la ubiquitina, però hi ha d'altres que presenten una estructura similar i la seva conjugació atribueix diferents qualitats a la proteïna diana. Aquests altres modificadors són SUMO, RUB-1 (també anomenat Nedd8) (Rabut i Peter 2008), Apg8 i Apg12 (Ichimura *et al.* 2000), UFM-1 i HUB-1 (Downes i Vierstra 2005). En base a l'àmplia influència sobre les proteïnes diana, els polipèptids com a modificadors, desenvolupen un paper important en la regulació de les cèl·lules vegetals.

2 La Sumoilació com a modificació

SUMO va ser descobert per primer cop en animals durant estudis d'import nuclear en cèl·lules de mamífer com a modificador covalent de RanGAP1, una proteïna associada al complex del porus nuclear. Al seqüenciar RanGAP1 es va descobrir que posseïa dos extrems N-terminal però un sol extrem C-terminal, indicant que contenia un segon polipèptid unit mitjançant un enllaç isopeptídic (Matunis *et al.* 1996). Aquest polipèptid unit se'l va anomenar SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) basat en la seva semblança a la ubiquitina (Mahajan *et al.* 1997). Aquesta modificació direcciona RanGAP1 des del citosol cap al complex del porus nuclear on és requerit per l'import nuclear de proteïnes, activant l'activitat GTPasa de la proteïna transportadora citosol/nuclear Ran (Mahajan *et al.* 1998). SUMO va ser també identificat en estudis posteriors on va ser anomenat Sentrin, Smt 3, UBL1, GMP o PIC1 (Boddy *et al.* 1996; Mannen *et al.* 1996; Okura *et al.* 1996; Shen *et al.* 1996).

3 Estructura de SUMO i isoformes

SUMO té en comú tan sols un 18% d'identitat de seqüència amb la ubiquitina, encara que anàlisis estructurals per ressonància magnètica (NMR) van revelar que ambdues proteïnes presenten una estructura tridimensional molt semblant (Bayer *et al.* 1998). Posteriorment, l'estructura de SUMO de *Saccharomyces cerevisiae* va ser determinada després de co-cristal·lització amb Ulp1 (Mossessova i Lima 2000) i en solució amb i sense Ubc9 (Sheng i Liao 2002) (fig. 1). L'estructura d'aquestes proteïnes presenta una forma d'un paquet globular molt compacte amb les fulles- β enrotllades a una hèlix- α . Una característica que comparteixen SUMO i ubiquitina és el motiu Gly-Gly a l'extrem C-terminal d'ambdues proteïnes, i que és el lloc d'unió a les proteïnes diana. La topologia de càrrega de la superfície de SUMO és diferent a la de la ubiquitina, indicant que interaccionen específicament amb diferents enzims. Mentre que la ubiquitina presenta una regió amb càrregues positives, SUMO mostra una càrrega de superfície negativa, complementària a la càrrega de superfície de la regió

d'interacció del seu enzim conjugador Ubc9 (Muller *et al.* 2001). Altra diferència consisteix en que les proteïnes SUMO contenen una extensió N-terminal d'uns 22 residus que no està present a la ubiquitina.

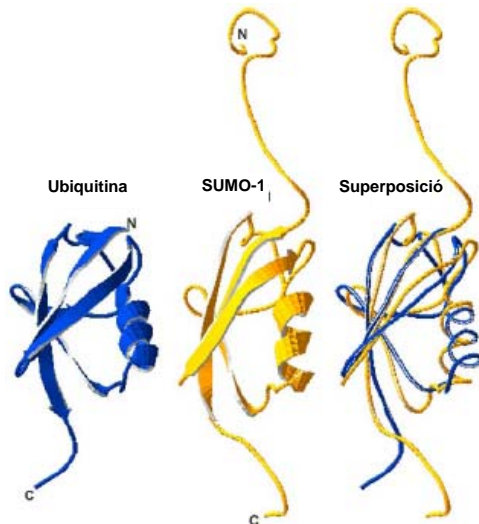


Figura 1. Diagrama en cintes remarcant la similitud de l'estructura tridimensional de la ubiquitina i el SUMO1 humà. (adaptat de Dohmen 2004). Ambdues proteïnes presenten un plegament molt compacte $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$. Ressalta l'extensió N-terminal de SUMO que no presenta la ubiquitina. Per determinar l'estructura de la ubiquitina es va utilitzar cristal·lografia de raigs X (Vijay-Kumar *et al.* 1987); l'estructura de SUMO va ser determinada en solució per la tècnica NMR (Bayer *et al.* 1998).

SUMOs són proteïnes d'11kDa presents a tot el regne eucariota i estan fortament conservades des de llevats fins a humans. El llevat i els invertebrats estudiats fins al moment, contenen un sol gen que codifica per a SUMO, anomenat SMT3. Aquest gen és essencial per la viabilitat del llevat *S.cerevisiae* (Johnson i Blobel 1997).

La família de SUMO en mamífers consisteix en quatre membres, anomenats SUMO1, SUMO2, SUMO3 i SUMO4. Una substitució de la glutamina 90 per un residu prolina a SUMO4 evita el seu processament, per tant és poc probable la seva conjugació *in vivo*. La seva funció biològica no resulta clara, i de tenir-la, seria probablement una funció especialitzada mitjançada per interaccions no covalents (Owerbach *et al.* 2005). SUMO2 i 3 són gairebé idèntics en la seva seqüència i sembla que actuen d'una manera redundant. Aquestes dues isoformes són significativament diferents de SUMO1, presentant tan sols un 50% d'identitat. La varietat funcional entre SUMO1 i SUMO2/3 resideix en les respectives diferents distribucions intracel·lulars, els diferents canvis en el seu patró d'expressió i conjugació en les respostes a estrès, i les diferències en les seves interaccions amb proteïnes efectores i les isopeptidases específiques de SUMO (Saitoh i Hinchev 2000; Mukhopadhyay i Dasso 2007). Altra diferència entre SUMO1 i SUMO2/3 és que aquests últims presenten una seqüència consens per a la unió de

SUMO (ψ KXE\D, on ψ és un residu hidrofòbic alifàtic, X és qualsevol residu i K, E i D corresponen a l'estàndard de símbols d'una lletra per aminoàcids; K és la lisina on s'uneix SUMO) a l'extensió N-terminal. Degut a aquesta característica, SUMO2/3 poden formar cadenes polimèriques *in vitro* i *in vivo* igual que la ubiquitina (Vertegaal 2007; Ulrich 2008). El primer treball on es va descriure l'existència d'una unió SUMO-SUMO en un substrat fisiològic va ser a la histona deacetilasa HDAC4 (Tatham *et al.* 2001). Es va observar que aquesta proteïna tan sols presentava un lloc de sumoilació en K₅₅₉, però s'observaven 2 conjugats, i el de major mida depenia de la presència de la K₁₁ al modificador (SUMO). Malgrat aquestes cadenes poliSUMO són detectades tant en llevat com mamífers (Tatham *et al.* 2001; Bylebyl *et al.* 2003; Matic *et al.* 2008; Windecker i Ulrich 2008), la seva funció biològica no està clara. En llevat, podrien contribuir a la integritat estructural del complex sinaptonemal durant la meiosi (Cheng *et al.* 2006).

A plantes encara s'han identificat més gens que codifiquen per SUMO que a mamífers. El genoma del model de planta *Arabidopsis thaliana* té nou gens que presenten similitud a les proteïnes SUMO d'animals i fongs (Taula 1) (Kurepa *et al.* 2003). Un d'ells, anomenat AtSUMO9, sembla ser un pseudogen i no codifica per a una proteïna completa de SUMO. La família de gens de AtSUMO deriva de reorganitzacions del genoma. Per exemple, AtSUMO2 i AtSUMO3, a l'igual que AtSUMO4 i AtSUMO6, estan situats molt prop al genoma i són nombrats com a exemples de duplicació en tàndem (http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/TandemDups/duplication_listing.html). Probablement sigui el mateix cas per a AtSUMO7 i AtSUMO8. Al comparar les diferents seqüències s'observa que AtSUMO1/AtSUMO2, AtSUMO4/AtSUMO6, i AtSUMO7/AtSUMO8 respectivament, són molt similars (fig. 2). *AtSUMO5* és el més diferent en quant a seqüència de totes les isoformes de SUMO d'*Arabidopsis*. S'han identificat ESTs (de l'anglès Expressed Sequence Tags) per a *AtSUMO1*, *AtSUMO2*, *AtSUMO3* i *AtSUMO5*, evidenciant la seva expressió *in vivo*. Els nivells d'expressió de *AtSUMO4*, *AtSUMO6*, *AtSUMO7* i *AtSUMO8*, si és que en tenen, són presumiblement molt baixos. A més, la parella AtSUMO4/6 no presenta la firma comuna a tota la família, el motiu Gly-Gly a l'extrem C-terminal, requerit per la conjugació i desconjugació.

Activitat proteica	Gen	Cromosoma	n° AGI ^a	Expressió (ESTs) ^b
SUMO	<i>AtSUMO1</i>	4	At4g26840	Sí (192)
	<i>AtSUMO2</i>	5	At5g55160	Sí (104)
	<i>AtSUMO3</i>	5	At5g55170	Sí (2)
	<i>AtSUMO4</i>	5	At5g48170	No
	<i>AtSUMO5</i>	2	At2g32760	Sí (33)
	<i>AtSUMO6</i>	5	At5g48700	No
	<i>AtSUMO7</i>	4	NA	No
	<i>AtSUMO8</i>	4	NA	No
	<i>AtSUMO9</i>	4	NA	No
E1	<i>AtSAE1a</i>	4	At4g24940	Sí (73)
	<i>AtSAE1b</i>	5	At5g50580	Sí (33)
	<i>AtSAE2</i>	2	At2g21470	Sí (11)
E2	<i>AtSCE1a</i>	3	At3g57870	Sí (255)
	<i>AtSCE1b</i>	5	At5g02240 ^c	No
E3	<i>AtSIZ1</i>	5	At5g60420	Sí (58)
SUMO proteasa	<i>AtULP1a</i>	3	At3g06910	Sí (11)
	<i>AtULP1b</i>	4	At4g00690	Sí (3)
	<i>AtULP1c</i>	1	At1g10570	Sí (11)
	<i>AtULP1d</i>	1	At1g60220	Sí (38)
	<i>AtULP2a</i>	2	NA	No
	<i>AtULP2b</i>	2	At2g24930	No
	<i>AtULP2c</i>	4	At4g08430	No
	<i>AtULP2d</i>	4	At4g04130	No
	<i>AtULP2e</i>	4	At4g19310	No
	<i>AtULP2f</i>	5	At5g34990	No
	<i>AtULP2g</i>	2	At2g05560	No
<i>AtULP2h</i>	2	At2g16180	No	

Taula 1. Components de la maquinària de sumoilació a *Arabidopsis*.

a AGI, Arabidopsis Genome Initiative; NA, no anotat.

b Expressió confirmada per la presència de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) (número entre parèntesi) en la base de dades d'*Arabidopsis* (www.arabidopsis.org).

c La predicció de seqüència per a SCE1b comença a la posició 84829 i finalitza a la 85306.

Totes les isoformes de AtSUMO que s'expressen en uns alts nivells estan involucrades en reaccions de conjugació. Anticossos dirigits contra AtSUMO1/2 (Lois *et al.* 2003; Murtas *et al.* 2003), i altres dirigits contra AtSUMO3 (Kurepa *et al.* 2003) indiquen que aquestes isoformes de SUMO són capaces de formar conjugats amb proteïnes *in vivo*. Pel que respecta a AtSUMO5, també s'ha descrit que és capaç de formar conjugats *in vivo*, encara que aquests conjugats només s'han descrit en plantes transgèniques sobreexpressores d'aquesta isoforma (Budhiraja *et al.* 2009).

A



B

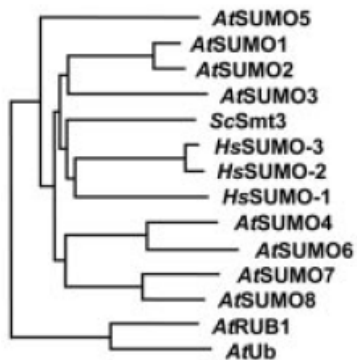


Figura 2. Comparació de les seqüències dels ortòlegs de SUMO a *Arabidopsis*. (Adaptat de Kurepa *et al.* 2003) (A) Alineament de les seqüències aminoacídiques dels ortòlegs de SUMO d'*Arabidopsis*, l'humà HsSUMO1, i de *Drosophila* i llevat (ScSmt3 i DmSmt3). Amb requadre es remarca els potencials llocs de sumoilació. Els aminoàcids conservats es remarquen en gris. (B) Representació en arbre filogenètic de la distància de la seqüència aminoacídica entre els ortòlegs de SUMO.

4 La maquinària de conjugació de SUMO a *Arabidopsis*

La via de conjugació de SUMO (anomenada sumoilació) és mecànicament anàloga a la conjugació d'ubiquitina (anomenada ubiquitinació). Els enzims de la via de conjugació de SUMO, encara que són similars als de la via d'ubiquitinació, són específics per SUMO i no tenen cap funció en la conjugació d'ubiquitina.

La sumoilació requereix un conjunt específic d'enzims (fig. 3). Com la ubiquitina, totes les formes de SUMO es sintetitzen com a precursors inactius. El processament de l'extrem C-terminal genera la forma madura de la proteïna deixant un residu glicina exposat a l'extrem carbonil. Aquest processament està catalitzat per un grup específic de cisteïna-proteases, anomenades ULPs (de l'anglès, Ubiquitin-Like Protease) o proteases específiques de SUMO (Li i Hochstrasser 2000; Hay 2007) (fig. 3). El

processament es dona a 3' del residu glicina conservat. D'aquesta manera queda exposat a l'extrem C-terminal el motiu doble glicina, motiu que és requerit per a la formació de la unió SUMO-substrat. Aquest motiu està fortament conservat a totes les proteïnes SUMO tant animals, fúngiques com de plantes. En aquest últim cas, a excepció de AtSUMO4, AtSUMO6 i AtSUMO7 que presenten una serina-glicina. La unió entre SUMO i el seu substrat és un enllaç isopeptídic entre l'extrem carboxil de SUMO i el grup ϵ -amino d'una lisina en la proteïna diana.

Posteriorment a la maduració de SUMO, es produeix la seva activació mitjançant l'enzim activador de SUMO (SAE o E1). Aquest enzim (SAE) catalitza una activació dependent d'ATP de l'extrem carboxi terminal de SUMO i és quan el SUMO activat es transferit a l'enzim conjugador de SUMO (SCE o E2), anomenat Ubc9 a *S.cerevisiae*. A continuació, aquest enzim transfereix SUMO al residu lisina del substrat amb l'ajut d'una lligasa de SUMO (E3). Moltes de les lisines on s'uneix SUMO estan en la seqüència consens ψ KXE/D on ψ és un residu hidrofòbic, generalment isoleucina, leucina o valina; K és la lisina que es modifica; X pot ser qualsevol residu; E és àcid glutàmic i D és àcid aspàrtic (Rodriguez *et al.* 2001). Estudis estructurals mostren un reconeixement directe entre SCE i la seqüència consens de sumoilació. A més s'ha vist que proteïnes recombinants SAE, SCE i SUMO són suficients per sumoilar substrats *in vitro* en una reacció dependent d'ATP (Bernier-Villamor *et al.* 2002). Les lligases de SUMO incrementen l'eficiència de la conjugació de SUMO al interaccionar i orientar en una posició òptima el complex SUMO-SCE per a la conjugació (Reverter i Lima 2005). La sumoilació és un procés dinàmic i reversible. La ruptura de l'enllaç entre SUMO i el seu substrat (anomenat desumoilació o desconjugació) es catalitza per ULPs que específicament trenquen l'enllaç a l'extrem carboxil de SUMO. *In vitro*, ULPs catalitzen tan la maduració de SUMO com el trencament de l'enllaç isopeptídic entre SUMO i la proteïna diana.

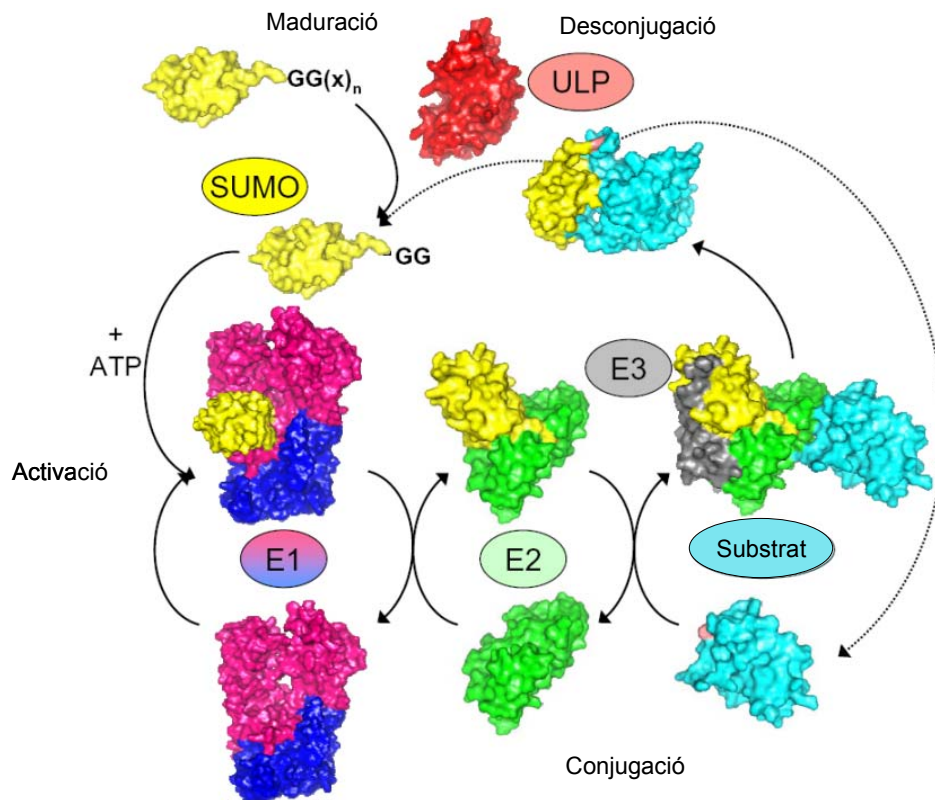


Fig. 3. El cicle de sumoïlació i desumoïlació a *Arabidopsis*. *Maduració*: SUMO és sintetitzat com a proteïna precursora. Aquest precursor es processa per unes cisteïna-proteases específiques (ULP, de l'anglès Ubiquitin-Like Protease). Aquest processat deixa exposat a l'extrem carboxil terminal de SUMO el motiu glicina-glicina (GG). *Activació* (E1): SUMO és activat per l'heterodímer E1 o enzim activador (Sae1 i Sae2) que catalitza la hidròlisi d'ATP per formar SUMO-AMP. Posteriorment, AMP és alliberat de SUMO amb la formació d'un enllaç tioéster d'alta energia entre el grup carboxil de G de SUMO i el grup sulfidril de la cisteïna catalítica de Sae2. *Conjugació* (E2): SUMO és transferit a una cisteïna de E2 o enzim conjugador (SCE1) per transesterificació catalitzada per SCE1. *Lligació* (E3): SUMO és transferit al grup ε-amino de la cadena lateral de la lisina (K) de la seqüència consens ψKXE/D (ψ, residu gran i hidrofòbic, X, qualsevol aminoàcid, E/D, àcid glutàmic/àcid aspàrtic,) de la proteïna diana. En aquest procés pot participar una E3 lligasa de SUMO. *Desconjugació*: Una proteasa específica de SUMO amb activitat isopeptidasa trenca l'enllaç isopeptídic i SUMO és reciclat per al sistema de conjugació.

4.1 Enzim activador de SUMO (SAE)

Igual que l'E1 de la via de conjugació d'ubiquitina, l'enzim activador de SUMO activa SUMO al residu glicina de l'extrem carboxil (fig. 3). L'enzim activador de SUMO (SAE) és un heterodímer format per dues subunitats SAE1 i SAE2, de 40 kDa i 70 kDa respectivament (Dohmen *et al.* 1995; Desterro *et al.* 1999). La subunitat SAE1 mostra

similitud a la meitat amino-terminal i la subunitat SAE2 a la meitat carboxi-terminal de l'enzim activador d'ubiquitina (Johnson *et al.* 1997). *A. thaliana* conté dos gens que codifiquen per a la subunitat petita, AtSAE1a i AtSAE1b. AtSAE1a i AtSAE1b estan en segments que s'han duplicat entre els cromosomes 4 i 5. La subunitat gran, AtSAE2 està codificada per una sol gen al genoma d'*Arabidopsis* (Kurepa *et al.* 2003) i és essencial per la viabilitat de la planta (Saracco *et al.* 2007). SAE2 conté tres dominis, el domini de la cisteïna catalítica, el domini d'adenilació i el domini Ubl. A mamífers, l'extrem C-terminal de SAE2 conté una senyal de localització nuclear que podria ser important per a l'enriquiment de la maquinària de SUMO al nucli. Aquesta subunitat adopta una estructura en forma de U on el domini d'adenilació es manté a la base, i el domini Ubl i el de la cisteïna catalítica a ambdós costats. El domini de la cisteïna catalítica conté la cisteïna catalítica que es troba localitzada en un llaç (*loop*) i és la responsable de la formació de l'enllaç tioéster E1-SUMO (Lois i Lima 2005).

Basant-se en les dades estructurals disponibles de E1 i les aproximacions genètiques i bioquímiques, s'ha suggerit un mecanisme d'activació de SUMO en sistemes mamífers (Lois i Lima 2005). Es proposa que SUMO és reconegut exclusivament per la subunitat gran de l'enzim activador (SAE2), ja que no s'han observat interaccions entre SUMO i la subunitat petita (SAE1). L'enzim activador de SUMO (SAE) catalitza una reacció en tres parts. Primer, la subunitat gran de l'enzim activador, SAE2, reconeix SUMO i es formen diverses interaccions entre diferents residus de les dos proteïnes que les mantenen unides.

La superfície de SUMO que interacciona amb SAE2 representa aproximadament el 20% de tota la seva superfície, s'observen contactes entre SAE2 i els residus de SUMO Gln29, Ser31, Asn60, Arg70, Glu89, Tyr91, Glu93, Gln94, Thr95, Gly96, i Gly97. En aquest moment l'extrem C-terminal de SUMO queda en una òptima posició per atacar el grup α -fosfat de l'ATP, formant així un adenilat C-terminal SUMO i alliberat el pirofosfat. A continuació el grup tiol de la cisteïna del lloc actiu d'E1 ataca el SUMO adenilat, alliberant AMP i formant un enllaç tioéster d'alta energia entre la cisteïna catalítica de SAE2 i l'extrem C-terminal de SUMO. En un pas posterior es dona la interacció entre E2 i el complex SUMO-E1, aquest reconeixement es produeix entre el domini Ubl de SAE2 i SCE. És en aquest moment quan es produeix una tercera reacció,

una transesterificació on el SUMO activat és transferit a un residu cisteïna de SCE. En aquest pas de transferència de tioèster entre E1 i E2 és essencial la participació del domini Ubl de SAE2, que és l'encarregat d'interaccionar amb E2. S'ha descrit que mutants del llevat *S.cerevisiae* amb l'E1 amb el domini Ubl deletat són letals. A més, les formes de E1 amb el domini Ubl deletat, són capaços de produir la primera reacció d'adenilació de SUMO, però incapaçs de transferir SUMO des de E1 a E2 *in vitro* (Lois i Lima 2005).

4.2 Enzim conjugador de SUMO (SCE)

El següent pas a l'activació de SUMO és la seva transferència a la cisteïna catalítica de l'enzim conjugador de SUMO (SCE o E2) per formar el complex intermedi SUMO-E2 tioèster (Desterro *et al.* 1997; Johnson i Blobel 1997). SCE és l'enzim encarregat de transferir SUMO al substrat.

SCE és l'únic enzim conjugador de llevat i invertebrats, i probablement també de vertebrats. *A. thaliana* conté un pseudogen (AtSCE1b) i un gen actiu (AtSCE1a) que codifica per a l'enzim conjugador de SUMO (SCE1a), gen que és essencial per la viabilitat de la planta (Saracco *et al.* 2007). L'enzim conjugador de SUMO es denomina Ubc9 al llevat *S. cerevisiae* per la seva similitud a l'enzim conjugador d'ubiquitina i Hus5 al llevat *Schizosaccharomyces pombe*. Estudis de localització subcel·lular han descrit que AtSCE és predominantment una proteïna nuclear (Lois *et al.* 2003). La presència d'un sol SCE en la via de sumoilació contrasta amb la via de la ubiquitina, on existeixen múltiples enzims conjugadors d'ubiquitina que participen en la ubiquitinació de diferents grups de substrats (Bachmair *et al.* 2001). La reacció de conjugació de SUMO pot succeir sense l'ajut de proteïna lligases *in vitro*, encara que s'ha demostrat que la presència de lligases augmenta la conjugació de SUMO al substrat (Johnson 2004). SCE reconeix i s'uneix directament a la seqüència consens de sumoilació al substrat (ψ KXE\|D). Els residus de la seqüència consens interaccionen amb els residus que localitzen prop de la cisteïna catalítica de SCE mitjançant ponts d'hidrogen i interaccions electrostàtiques. Gràcies a aquestes interaccions, la lisina

receptora de SUMO queda perfectament orientada i és quan es produeix la transferència de SUMO des de SCE al substrat (Tang *et al.* 2008).

A banda d'aquestes interaccions, s'han descrit altres interaccions no covalents entre SUMO i SCE que es donen lluny del centre actiu d'E2. Recentment, s'ha descrit l'estructura del complex SUMO-Ubc9 per cristal·lografia i revela una superfície d'interacció conservada entre E2 i vèries isoformes de SUMO tant de llevat com d'humans (Capili i Lima 2007). Aquestes interaccions no covalents entre Ubc9 i SUMO estan conservades en la via de conjugació d'ubiquitina, suggerint que aquestes interaccions E2-Ub/Ubl estan conservades en varies rutes de conjugació Ub/Ubl. En la ruta de conjugació d'ubiquitina, s'ha descrit la importància d'aquestes interaccions E2-Ub en la formació de cadenes de poli-ubiquitina (Brzovic *et al.* 2006). De forma paral·lela, aquestes interaccions també podrien desenvolupar una funció similar en el sistema de conjugació de SUMO, en la formació de cadenes de poliSUMO (Knipscheer *et al.* 2007).

4.3 Lligases de SUMO

Les lligases de SUMO o E3 són proteïnes que interactuen amb SCE i contribueixen a la transferència de SUMO des de SCE a proteïnes substrat. Mentre que la presència de l'enzim activador (SAE) i l'enzim conjugador de SUMO (SCE) és suficient per la sumoilació de diversos substrats *in vitro*, s'ha demostrat que *in vivo* la majoria de les reaccions de conjugació de SUMO requereixen activitat lligasa (Johnson i Gupta 2001; Kahyo *et al.* 2001; Takahashi *et al.* 2001; Kirsh *et al.* 2002; Schmidt i Muller 2002). Existeixen diverses classes de lligases de SUMO, totes elles interaccionen amb SCE i incrementen la sumoilació tan *in vitro* com *in vivo*.

Existeixen diferents tipus de lligases E3. Les primeres E3 en ser identificades i les més caracteritzades són el grup anomenat SIZ a llevat i PIAS a mamífers. Aquestes proteïnes presenten un domini RING en forma de dit anomenat motiu SP-RING (Hochstrasser 2001). Igual que el domini en forma de dit RING a les E3s específiques d'ubiquitina, aquest domini és requerit per l'activitat lligasa, encara que no contribueix

amb cap residu catalític important per la transferència de SUMO (Hochstrasser 2001). Les lligases E3 interaccionen amb el complex E2-SUMO de forma no covalent, per tant, és probable que actuïn com una plataforma d'unió que coordina el contacte entre E2 i el substrat i orientar SUMO d'una manera òptima per la seva transferència (Palvimo 2007).

La proteïna específica del porus nuclear RanBP2 representa un segon tipus de lligases de SUMO E3 (Pichler *et al.* 2004). Aquest enzim no s'assembla a cap enzim específic d'ubiquitina o qualsevol SUMO E3. Un domini curt i desestructurat de RanBP2 és capaç de catalitzar la reacció de sumoilació al plegar-se al voltant del complex E2-SUMO i posicionant SUMO en una posició favorable per l'atac a la lisina del substrat (Reverter i Lima 2005).

Una altra categoria de SUMO E3s està representada pel grup de proteïnes polycomb Pc2, les quals promouen la sumoilació del correpressor transcripcional CtBP *in vivo* i *in vitro* (Kagey *et al.* 2003). Encara que la seva millora de l'eficiència de conjugació de SUMO *in vitro* és modesta, i a més, altres lligases poden millorar la sumoilació de CtBP. Per tant, no està massa clar si Pc2 es pot considerar una lligasa de SUMO o més bé un factor que promou la sumoilació de CtBP de manera indirecta al establir la proteïna diana o promovent interaccions proteïna-proteïna (Wotton i Merrill 2007).

De forma semblant, la histona deacetilasa HDAC4, que en sí mateixa és una diana de SUMO, es va demostrar que estimula la conjugació de SUMO en diversos contextos, però una altra vegada, s'ha de determinar si aquesta activitat s'ajusta al criteri d'una lligasa de SUMO (Zhao *et al.* 2005).

El genoma d'*A. thaliana* conté sols un gen, SIZ1, que és l'ortòleg de la E3 lligasa SIZ1/SIZ2 de llevat. Com a E3 de SUMO, aquesta proteïna desenvolupa una funció d'adaptador entre el complex E2-SUMO i la proteïna diana. S'ha descrit que AtSIZ1 conté un domini SP-RING i un domini PHD que són necessaris per la seva funció lligasa de SUMO. Aquests dominis presenten una estructura en forma de dit RING amb capacitat d'interaccionar amb E2 i amb un substrat de SUMO (GTE3) (Garcia-Dominguez *et al.* 2008). En aquests estudis s'ha proposat un model d'interaccions que expliquen la sumoilació mediada per AtSIZ1 de la proteïna GTE3 i la funció lligasa del

domini PHD. Aquests autors proposen que en el moment que GTE3 ocupa el domini SP-RING o el domini PHD de AtSIZ1, l'enzim conjugador ocupa el domini que queda lliure per mediar la sumoilació. En absència del domini PHD, el substrat de SUMO i E2 competeixen per unir-se al mateix lloc de AtSIZ1 i s'exclouen mútuament impossibilitant la reacció de sumoilació.

Paral·lelament, diferents anàlisis de plantes mutants per AtSIZ1 han demostrat que aquesta proteïna està implicada en la regulació de l'expressió de gens involucrats en el desenvolupament de la planta i en respostes a diferents tipus d'estressos abiòtics (Miura *et al.* 2005; Yoo *et al.* 2006; Catala *et al.* 2007; Miura *et al.* 2007).

4.4 Proteases de SUMO

L'escissió de SUMO de la seva proteïna diana (desumoilació o desconjugació) està catalitzada per proteases específiques de SUMO (Hay 2007; Mukhopadhyay i Dasso 2007). Els enzims amb aquesta activitat tenen diverses funcions en la sumoilació. Aquests enzims separen SUMO de proteïnes diana, fent la modificació reversible, alhora que constitueixen una font de SUMO lliure per ser utilitzat per la conjugació d'altres proteïnes. A més, aquestes proteases són les mateixes que s'encarreguen de madurar SUMO, eliminant els residus que estan a 3' de la doble glicina i deixant exposat el grup carboxil de la G a l'extrem C-terminal que formarà l'enllaç isopeptídic amb el grup ϵ -amino de la lisina del substrat. Les proteases de SUMO són un punt important en el control de la sumoilació ja que regulen tant la disponibilitat de SUMO lliure per ser conjugat com l'estat de sumoilació de proteïnes individuals. Totes les proteases de SUMO contenen un domini de 200 aminoàcids aproximadament (domini Ulp), el qual presenta la capacitat de trencar l'enllaç SUMO-proteïna diana (Mossesso i Lima 2000). El domini Ulp no presenta similitud de seqüència amb els enzims que escindeixen ubiquitina dels seus substrats, mentre que sí està relativament relacionat a un nombre de proteases virals (Li i Hochstrasser 1999).

A *S. cerevisiae* s'han caracteritzat dos proteases de SUMO, Ulp1 i Ulp2. Ambdues proteases són capaces de processar l'extrem carboxil de SUMO i també desconjugar

SUMO. A pesar d'aquesta característica, Ulp1 i Ulp2 no són redundants ja que presenten una localització subcel·lular i unes preferències de substrat diferents (Li i Hochstrasser 2000). A mamífers, s'ha trobat fins a set gens que codifiquen per a proteïnes amb domini Ulp. Aquestes proteïnes s'anomenen SENPs (de l'anglès SENtrin Proteases). Els ortòlegs de proteases de SUMO a *Arabidopsis* s'anomenen AtULPs (Kurepa *et al.* 2003). AtULP1a, AtULP1c també anomenada OTS2, AtULP1d també anomenada OTS1, i AtESD4 (Murtas *et al.* 2003; Chosed *et al.* 2006; Colby *et al.* 2006; Conti *et al.* 2008). Aquestes s'han caracteritzat funcionalment com a proteases de SUMO i presenten tant l'activitat proteasa per alliberar SUMO dels seus substrats com per madurar SUMO. Els centres catalítics de les AtULP1 presenten similitud de seqüència entre ells i amb el de la proteasa Ulp1 de llevat, en canvi les regions amino terminal tenen una similitud limitada. Es pensa que aquesta regió N-terminal és la responsable de la especificitat de reconeixement SUMO-proteïna i la modulació de l'activitat enzimàtica. AtULP1a pot trencar l'enllaç isopeptídic entre AtSUMO3 i conjugats *in vitro*, però no AtULP1c ni AtESD4. A més, AtULP1a presenta major activitat SUMO peptidasa (maduració de SUMO) que isopeptidasa (desumoilació), mentre que AtESD4 té major activitat de desconjugació (Chosed *et al.* 2006). S'ha descrit també una interacció entre AtESD4 i el complex del porus nuclear necessària per la desumoilació de substrats de SUMO en l'embolcall nuclear (Xu *et al.* 2007).

5 Especificitat de substrat en la sumoilació

SUMO és conjugat a la majoria de proteïnes a un residu lisina situat en la seqüència consens ψ KXE\D. S'ha vist que la presència de E1 i E2 es suficient per reconstituir la conjugació de SUMO *in vitro*, encara que s'ha demostrat que les lligases de SUMO augmenten l'eficiència de sumoilació *in vitro*. Per tant, l'enzim conjugador no sols té la capacitat de catalitzar la transferència de SUMO al substrat, sinó que també té la capacitat de seleccionar d'una manera específica la lisina a modificar.

El motiu ψ KXE\D és molt curt i es troba a moltes proteïnes, la majoria de les quals probablement no són modificades per SUMO. Per exemple, dels 5884 ORF (de l'anglès

Open Reading Frames) en *S. cerevisiae*, hi ha 2799 seqüències consens de sumoilació (IVL)KXE distribuïdes en 1913 ORF diferents (Johnson 2004). Per tant, és probable que altres interaccions entre Ubc9 i el motiu ψ KXE\D siguin crítiques en determinar quines proteïnes són sumoilades. La majoria d'aquestes probables interaccions es donarien entre una E3 i el substrat o proteïnes associades al substrat. Encara que en l'estructura del complex RanGAP1-Ubc9 mostra un contacte addicional a la interacció ψ KXE\D (Bernier-Villamor *et al.* 2002), suggerint que altres interaccions entre el substrat i Ubc9 poden participar en la selecció del substrat. A més, dades d'estructura d'aquest complex indiquen que la seqüència consens de sumoilació ha d'estar posicionada en un accessible llaç (*loop*) (Bernier-Villamor *et al.* 2002).

Per altra banda, s'han identificat substrats de SUMO que no presenten el tetrapèptid consens. Una possible explicació a aquest fet és que el motiu ψ KXE\D serviria com a seqüència consens sols per a una subclasse de proteïnes diana amb una estructura definida. Per exemple, la sumoilació de l'enzim E2 d'ubiquitina E2-25-K, està dictada per característiques estructurals de les regions veïnes a la K diana. Aquesta proteïna és sumoilada en una lisina no consens situada en una α -hèlix, mentre que al voltant hi ha lisines consens que no són modificades (Pichler *et al.* 2005). De manera similar, la proteïna PCNA (de l'anglès Proliferating-Cell Nuclear Antigen) és sumoilada en dos residus lisina: una es troba en una seqüència consens, en canvi l'altra no està en una seqüència consens i es troba en una punta protuberant de l'estructura de PCNA (Hoegel *et al.* 2002). Malgrat aquests exemples, no totes les seqüències consens situades en una regió flexible són sempre sumoilades, per tant són necessaris altres determinants d'especificitat per la sumoilació. Hi ha treballs on es descriu que a més de la seqüència consens es necessiten altres factors, com per exemple el cas de la proteïna HSF1 (de l'anglès *Heat-Shock Factor*), que per ser sumoilada necessita ser abans fosforilada a la posició +3 de la seqüència consens amb la seqüència d'aminoàcids SP (Hietakangas *et al.* 2003). Aquesta seqüència s'ha vist que està conservada amb altres factors de transcripció i s'anomena motiu PDSM (Anckar i Sistonen 2007). Per altra banda, també s'ha descrit la importància dels residus propers a la seqüència consens. S'ha observat que hi ha un predomini clar de residus amb càrrega negativa en les 10 posicions a 3' del motiu consens. Aquests motius s'anomenen NDSM (Yang *et al.* 2006).

6 Substrats i funcions de la modificació per SUMO

Des de la identificació de la primera proteïna modificada per SUMO, RanGAP en 1996 (Matunis *et al.* 1996), s'han descrit un gran nombre de proteïnes que són modificades postraduccionalment per SUMO, i nous substrats de SUMO continuen identificant-se a un alt ritme. El grup més destacat de proteïnes diana de SUMO identificades a mamífers són proteïnes involucrades en la transducció del senyal i la regulació transcripcional (Gill 2005). Altres dianes de SUMO estan involucrades en la reparació del DNA (Hoegge *et al.* 2002), la segregació de cromosomes (al-Khodairy *et al.* 1995), i el bloqueig de la ubiquitinació (Johnson 2004). Un exemple d'aquest últim és I κ B, un inhibidor de l'activador transcripcional κ B. I κ B pot ser modificat tant per SUMO com per ubiquitina per regular la seva vida mitja (Desterro *et al.* 1998).

La conseqüència funcional de l'addició de SUMO varia àmpliament d'un substrat a un altre. S'han observat diferents conseqüències de l'addició de SUMO, com canvis conformacionals de la proteïna diana, alteració de la localització cel·lular o la capacitat d'unir-se al DNA, o proveint d'una nova superfície d'interacció. A més d'aquesta gran varietat de conseqüències, SUMO està involucrat en un gran nombre de processos cel·lulars tan diversos com l'organització del citoesquelet, transport mediat per vesícules, remodelatge de la cromatina. S'ha dissenyat una xarxa funcional de la via de conjugació de SUMO a *S. cerevisiae* mitjançant anàlisi SGA (de l'anglès Synthetic Genetic Array) utilitzant diversos mutants de la maquinària de conjugació de SUMO (Δ siz1, Δ siz2, doble mutant Δ siz1_ Δ siz2, mms21-sp, ubc9-2, ulp1-333^{GG}, ulp2-DAmP, i smt3-331) (figura 4) (Makhnevych *et al.* 2009). Aquests resultats posen de manifest la importància i versatilitat d'aquesta modificació.

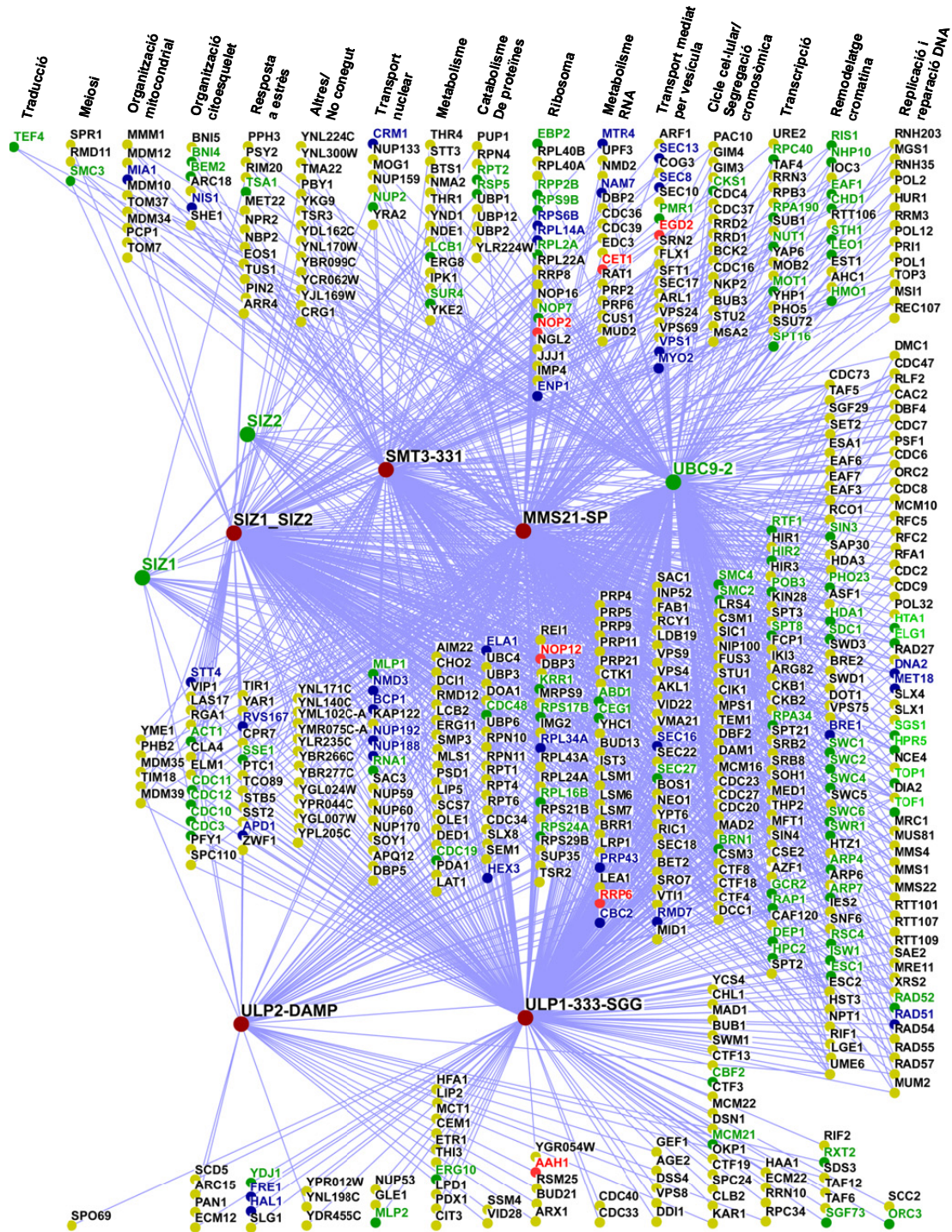


Fig. 4. La xarxa de connexions de la via de sumoïlació (adaptat de Makhnevych *et al.* 2009). Xarxa d'interaccions genètiques utilitzant l'anàlisi SGA (de l'anglès *Synthetic Genetic Array*) i introduint 8 soques mutants de la via de sumoïlació de *S. cerevisiae* (Δ siz1, Δ siz2, doble mutant Δ siz1_Δsiz2, mms21-sp, ubc9-2, ulp1-333^{CG}, ulp2-DAmP, i smt3-331) com a esquer. Es representen 1415 interaccions en 526 gens determinades per SGA. Es van classificar les interaccions en 15 processos biològics.

A *Arabidopsis* tan sols s'havia demostrat experimentalment la sumoilació de cinc proteïnes, AtMYB30, PHR1, ICE1, GTE3 i GTE5 (Colby *et al.* 2006; Garcia-Dominguez *et al.* 2008; Miura *et al.* 2007; Miura *et al.* 2005), fins que Budhiraja i col·laboradors, recentment han identificat 14 substrats de SUMO *in vivo*. Aquests substrats han estat identificats en plantes que expressen les diferents isoformes d'*Arabidopsis* fusionades a un epítot per poder purificar aquests conjugats i posteriorment seqüenciar-los per espectrometria de masses. Amb aquest anàlisi s'han identificat proteïnes que estan involucrades en la regulació de l'estructura de la cromatina, *splicing* o la traducció. Amb anterioritat, diferents estudis ja havien evidenciat el paper de la sumoilació en les respostes de la planta a diferents tipus d'estressos abiòtics. S'ha observat que els nivells de conjugats de SUMO en cèl·lules d'*Arabidopsis* augmenten dramàticament després d'una exposició a temperatures elevades, a H₂O₂, metanol o l'anàleg d'aminoàcid canavanina (Kurepa *et al.* 2003). Els nivells de conjugats de SUMO són restaurats a les cèl·lules amb la desaparició de l'estímul causant, posant de manifest la naturalesa reversible de la modificació. També s'ha descrit la implicació de la sumoilació en les respostes a ABA (àcid abscísic) mitjançant AtSUMO1/2 i AtSCE1 (Lois *et al.* 2003). Plantes sobreexpressores de AtSUMO1 o AtSUMO2 són menys sensibles a la inhibició del creixement de l'arrel per ABA. La inhibició de la sumoilació per co-supressió de AtSCE1 desencadena el fenotip oposat, la inhibició del creixement de l'arrel és més severa. A més, l'expressió dels gens induïts per estrès RD29A i AtPLC1 és major en plantes sobreexpressores de SUMO1 o SUMO2. La hormona ABA desenvolupa un paper important com a hormona que media la resposta a estrès (Leung i Giraudat 1998), suggerint una connexió amb la inducció de la sumoilació que provoca l'estrès.

En el cas de la lligasa de SUMO AtSIZ1, s'ha descrit la seva implicació en la regulació de l'expressió de gens involucrats en les respostes a deficiència de fòsfor i durant el procés d'aclimatació al fred (Miura *et al.* 2005; Miura *et al.* 2007). Els factors de transcripció PHR1 i ICE1, que regulen aquestes respostes a estrès, són sumoilats en presència de SIZ1. A més, s'ha descrit que aquest mutant presenta una tolerància basal a xocs de calor reduïda (Yoo *et al.* 2006). Posteriorment, també s'ha descrit la importància d'aquesta lligasa de SUMO en la regulació del creixement de la planta i en la resposta a estrès per sequera a través de la regulació de l'expressió gènica (Catala *et*

al. 2007). Per últim, també s'ha vist afectada la floració en aquestes plantes mutants de SIZ1, posant de manifest la implicació d'aquesta proteïna en la regulació d'aquest procés (Jin *et al.* 2008). Per altra banda, s'ha descrit que mutants en els gens AtESD4 (proteasa relacionada amb la família ULP) també causen floració primerenca que està associada a la regulació negativa del supressor floral FLC (Reeves *et al.* 2002; Murtas *et al.* 2003).

De forma paral·lela, també s'ha descrit la implicació de la sumoilació en les respostes de les plantes a estressos de tipus biòtic. S'han identificat varies espècies de bacteris patògens de plantes que injecten proteïnes amb activitat proteasa de SUMO en les cèl·lules de l'hoste després de la infecció. Amb la injecció d'aquestes proteases, aquests patògens atenuen l'acumulació de conjugats de SUMO *in planta* i presumiblement comprometen el sistema de defensa de l'hoste (Orth *et al.* 2000; Hotson *et al.* 2003).

2. OBJECTIUS

OBJECTIUS

Com ha quedat exposat en la introducció, la sumoilació és una modificació postraducciona molt important per la regulació de l'activitat, localització i estabilitat de les proteïnes de les cèl·lules eucariotes. El procés de conjugació de SUMO a un substrat específic està mediat per l'acció seqüencial de dos enzims, l'activador E1 i el conjugador E2. A *Arabidopsis*, al inici d'aquesta tesi s'havien identificat els diferents components de la maquinària de sumoilació mitjançant estudis d'homologia, però només s'havia validat funcionalment AtSCE1 com a l'enzim E2 responsable de la conjugació de SUMO. A nivell fisiològic, només es coneixia el paper de SUMO en floració, respostes a estrès i senyalització per àcid abscísic.

Així doncs, a partir d'aquest context, l'objectiu general d'aquesta tesi és caracteritzar la maquinària de sumoilació a *A. thaliana* i determinar el processos biològics que estan regulats per la conjugació de SUMO. L'abordatge d'aquest objectiu general s'ha realitzat mitjançant els següents objectius concrets:

1. Caracterització bioquímica de les isoformes de SUMO mitjançant l'anàlisi de la seva taxa de conjugació i la seva capacitat per establir interaccions no covalents específiques amb l'enzim conjugador.

2. Caracterització bioquímica i cel·lular de les isoformes de l'enzim activador de SUMO mitjançant l'anàlisi de la taxa de reacció que confereixen durant la conjugació de SUMO, l'estudi de la seva estabilitat i localització subcel·lular, i la seva contribució a la capacitat de conjugació de SUMO *in vivo*.

3. RESULTATS

Capítol I. Caracterització dels components de sumoilació

Com ja s'ha comentat a la introducció, a *Arabidopsis* hi ha fins a vuit isoformes de SUMO, de les quals s'ha detectat expressió de quatre d'elles, AtSUMO1, 2, 3 i 5. En el cas de l'heterodímer AtE1, hi ha dos gens que codifiquen per a AtSAE1 (AtSAE1a i AtSAE1b) i un que codifica per SAE2 (AtSAE2). Per altra banda, sols hi ha un gen que codifica per E2 (AtSCE1) i un que codifica per a E3 (AtSIZ1) i almenys 13 gens que codifiquen per a proteases de SUMO. Donada la complexitat del sistema de sumoilació a *Arabidopsis* en quant a nombre de components, es va procedir a una caracterització dels mateixos. Amb aquesta caracterització es pretenia avaluar la rellevància biològica de l'existència de les diferents isoformes de SUMO, SUMO1, 2, 3 i 5, i de les isoformes a i b de l'enzim activador de SUMO (AtE1). Aquest estudi es va realitzar per analitzar si les diferents isoformes podrien presentar alguna especificitat de funció o són un cas de redundància. Amb aquest objectiu s'ha analitzat el patró d'expressió de la maquinària de sumoilació, s'han realitzat estudis d'homologia de l'estructura primària i terciària de AtE1, de la seva localització subcel·lular i les propietats enzimàtiques de les diferents isoformes de AtSUMO i de AtE1.

1 Estudi del patró d'expressió dels components del sistema de sumoilació

1.1 Expressió de la maquinària de sumoilació

Es va analitzar in silico l'expressió dels components de la maquinària de sumoilació d'*Arabidopsis* mitjançant l'ús de la base de dades Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>). Es van analitzar els nivells de RNA missatger en estadi de plàntula i en diferents teixits de planta adulta, inflorescències,

roseta i arrels. Els components de la maquinària de sumoilació dels quals es van analitzar els nivells de mRNA van ser l'enzim activador (tant la subunitat gran, *AtSAE2*, com les dues isoformes de la subunitat petita, *AtSAE1a* i *AtSAE1b*), l'enzim conjugador (*AtSCE1*) i les isoformes de SUMO de les que s'ha detectat expressió (*AtSUMO1* i *AtSUMO2*, *AtSUMO3* i *AtSUMO5*). A la figura 5 s'observa que tots els components s'expressen a tots els teixits de la planta. Altra característica interessant és l'alt grau d'expressió de *AtSCE1* en comparació amb els gens que codifiquen per a *AtE1* (*AtSAE1a/b* i *AtSAE2*). En el cas de les dues isoformes de la subunitat petita de *AtE1* (*AtSAE1a* i *AtSAE1b*) no es van observar grans diferències en els nivells de mRNA de cadascuna als diferents teixits analitzats. Pel que respecta a les isoformes de SUMO, les que presenten una major expressió a qualsevol teixit, són *AtSUMO1/2* sempre en nivells semblants, exceptuant en les inflorescències on existeix un predomini de l'expressió de *AtSUMO1*.

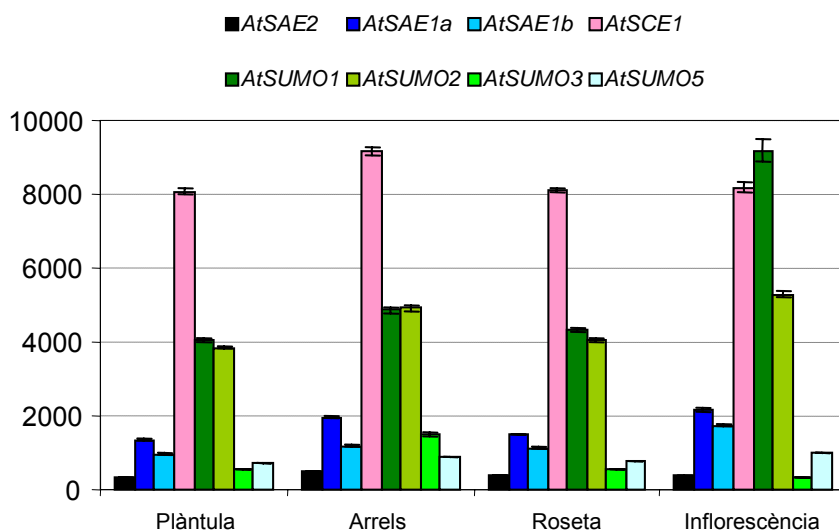


Fig 5. Nivells d'expressió dels diferents components del sistema de sumoilació a diferents teixits d'*A. thaliana* i diferents estadis de desenvolupament. Representats en diferents colors els nivells de mRNA dels diferents components de la sumoilació analitzats.

1.2 Patró d'expressió de les isoformes de la subunitat petita de l'enzim activador

Per avaluar en detall una possible especificitat espai-temporal de l'expressió de les dues isoformes de la subunitat petita de l'enzim activador d'*Arabidopsis* (*AtSAE1a* i *AtSAE1b*), es va analitzar el seu patró d'expressió en diferents teixits i estadis de desenvolupament de la planta per experiment d'hibridació de mRNA.

Primerament, es van dissenyar les sondes per hibridar amb cada mRNA. Donat l'alt grau d'homologia entre les dues isoformes, les sondes es van dissenyar per reconèixer a la zona 3'UTR de cadascuna d'elles, ja que aquesta és la zona on presenten menor homologia. L'anàlisi de l'expressió de les isoformes *AtSAE1a* i *AtSAE1b* es va realitzar utilitzant RNA total extret en diferents estadis de desenvolupament de la planta (estadi de cotilèdons, primer parell de fulles i segon parell de fulles) i de diferents teixits de la planta adulta (arrels, roseta, tija, flor i síliqua) (fig. 6).

L'anàlisi mostra, com ja suggeria l'anàlisi in silico, que les dues isoformes de la subunitat petita de l'enzim activador de SUMO s'expressaven en tots els estadis de desenvolupament i teixits analitzats. A més, no s'observaren grans diferències en els nivells d'expressió de les dues isoformes, en cap dels estadis o teixits analitzats.

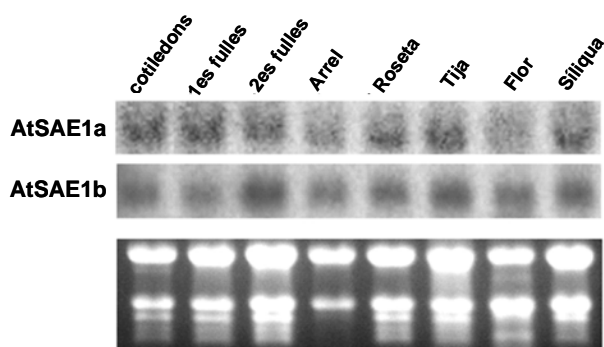


Fig. 6. Nivells d'expressió de mRNA que codifiquen per les dues isoformes de la subunitat petita de l'enzim activador. Anàlisi northern de l'expressió dels gens *AtSAE1a* i *AtSAE1b* sobre 10 µgRNA extret de diferents teixits de la planta i diferents estadis de desenvolupament. En la part inferior es mostra la tinció del gel amb EtBr com a control de càrrega.

Posteriorment a aquest estudi es va analitzar in silico l'expressió de les dues isoformes de l'enzim activador de SUMO segons la base de dades BAR

(<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (fig. 7). Aquesta base de dades proporciona un anàlisi tant a nivell de diferents estadis de desenvolupament com de diferents teixits de la planta adulta. A la figura 7 es mostra una comparació gràfica de l'expressió dels gens de les dues isoformes de la subunitat petita de l'enzim activador d'*A. thaliana*. En colors càlids es representa on predomina l'expressió de la isoforma *AtSAE1a* i en colors freds on predomina l'expressió d'*AtSAE1b*. En aquest anàlisi s'observaren algunes diferències en el patró d'expressió d'aquests dos gens, tot i que aquestes diferències no eren massa elevades. A la figura s'observa com als diferents estadis de desenvolupament de la llavor hi ha un predomini de l'expressió de la isoforma *AtSAE1b*. Per contra, en fulles adultes s'observa una major expressió de la isoforma *AtSAE1a* en comparació amb la isoforma *AtSAE1b*.

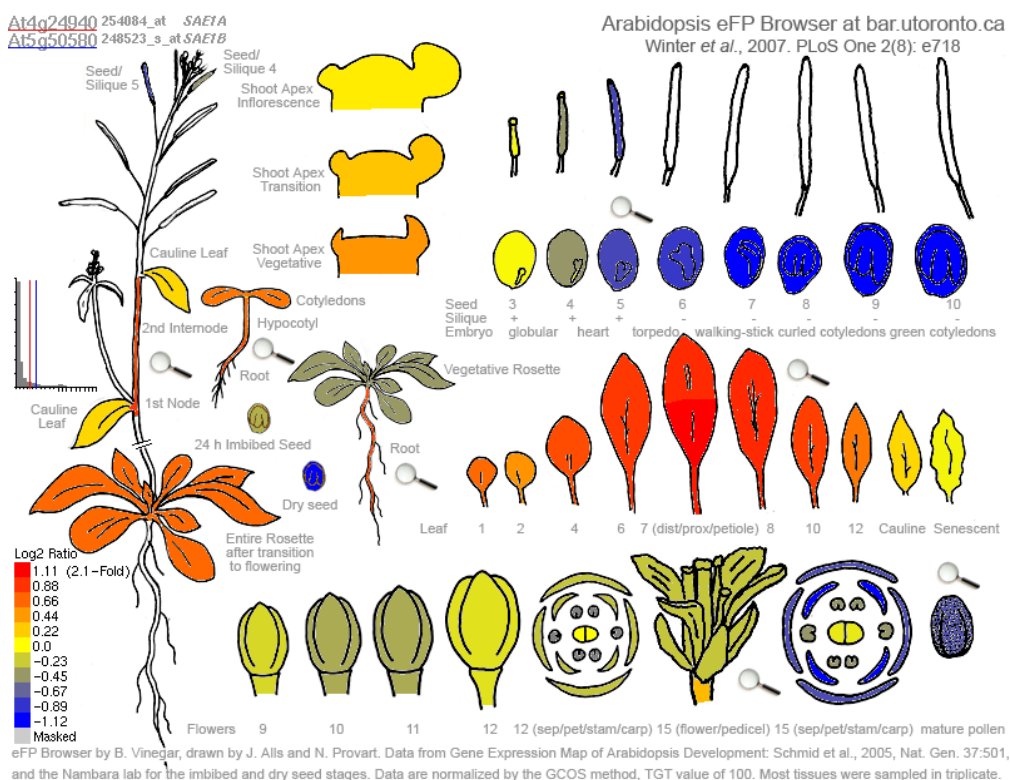


Fig. 7 . Patró d'expressió de les dues isoformes de la subunitat petita de l'enzim activador (*AtSAE1*) segons la base de dades BAR. Estudi de l'expressió en diferents teixits i diferents estadis de desenvolupament de la planta. Es compara l'expressió de les dues isoformes on els colors freds indiquen el predomini de l'expressió de la isoforma b i els colors càlids on predomina l'expressió de la isoforma a.

2 Estudis d'homologia de l'enzim activador (E1). Estructures primària i terciària

L'enzim activador de SUMO a *Arabidopsis* és un heterodímer que consta d'una subunitat petita, SAE1, i una subunitat gran, SAE2. Hi ha dos gens que codifiquen per a la subunitat petita (AtSAE1a i AtSAE1b) i un per a la subunitat gran (AtSAE2). Per tant existeixen dos isoformes per a l'enzim activador a *Arabidopsis*, AtE1a (AtSAE1a/AtSAE2) i AtE1b (AtSAE1b/AtSAE2). La primera aproximació que es va realitzar va ser l'alineament de cadascuna de les seqüències aminoacídiques d'aquestes proteïnes d'*Arabidopsis* amb els seus homòlegs humans (HsAos1 i HsSae2, respectivament) (fig. 8). A la figura, remarcats en negre s'indiquen els residus conservats, on s'observa l'existència de regions fortament conservades. En aquest aspecte, destaquen les regions conservades a l'extrem amino terminal de SAE2, que es corresponen amb el domini d'adenilació. En el cas de AtSAE1 també existeixen regions conservades. També cal destacar la deleció en la posició 185 que presenten les seqüències d'*Arabidopsis* en comparació al seu homòleg humà.

Altra aproximació va consistir en un estudi de l'estructura terciària d'aquest enzim. En base a l'estructura de l'enzim activador en humans (HsE1) resolta per cristal·lografia (Lois i Lima 2005), es va fer una predicció d'estructura per comparació (modelatge) (fig. 9.A). Per realitzar aquest modelatge es va utilitzar la seqüència de la isoforma AtE1a. Es va calcular la identitat de seqüència i la similitud de seqüència aminoacídica (representada a la figura entre parèntesi) de cada domini de la subunitat gran (AtSAE2) i de la subunitat petita (AtSAE1). Pel que respecta a AtSAE2, el domini d'adenilació és el que presentava un major grau de conservació, un 55% d'identitat de seqüència amb la forma humana, i fins a un 75% de similitud. El domini que conté la cisteïna catalítica té un 29% d'identitat de seqüència i un 52% de similitud. El domini UBL presentava un 31% d'identitat i un 47% de similitud. I la cua C-terminal d'aquesta subunitat, presentava un 17% d'identitat de seqüència i un 36% de similitud amb el seu homòleg humà.

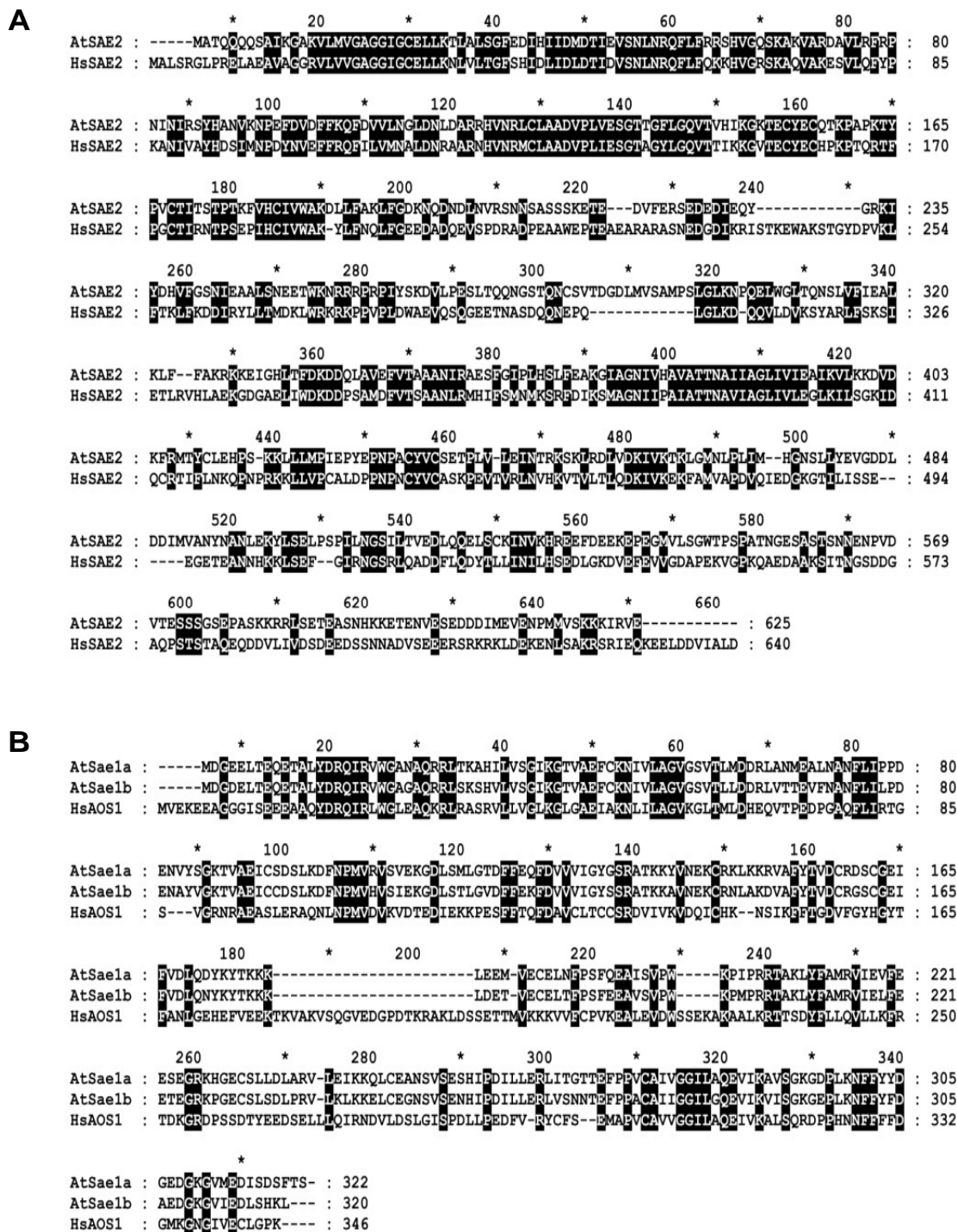


Fig. 8. Alineament de les seqüències aminoacídiques de les isoformes de l'enzim activador (E1) d'*A. thaliana* i el seu ortòleg humà. (A) Alineament de la seqüència aminoacídica de la subunitat gran (AtSAE2) i el seu ortòleg humà (HsSAE2). (B) Alineament de les seqüències aminoacídiques de les dues isoformes de la subunitat petita (AtSAE1) d'*A. thaliana* i l'homòleg humà (HsAOS1). Es representen remarcats en negre els residus conservats.

A la figura 9.B es representa l'estructura de l'heterodímer, comparant les dues isoformes d'*Arabidopsis* de la subunitat petita. En aquest cas també es va calcular el percentatge d'identitat de seqüència, que és d'un 80%, i el percentatge de similitud, de fins a un 89%. Es mostra l'estructura de la isoforma AtSAE1a, i les diferències de seqüència amb la isoforma AtSAE1b es representen en color marró. A l'analitzar les diferències es va observar que aquestes diferències estan repartides per tota la proteïna i no localitzen en cap regió concreta, suggerint així que no existeix cap regió fortament diferenciada entre AtSAE1a i AtSAE1b que podria intervenir en la regulació d'una manera específica en una isoforma o altra.

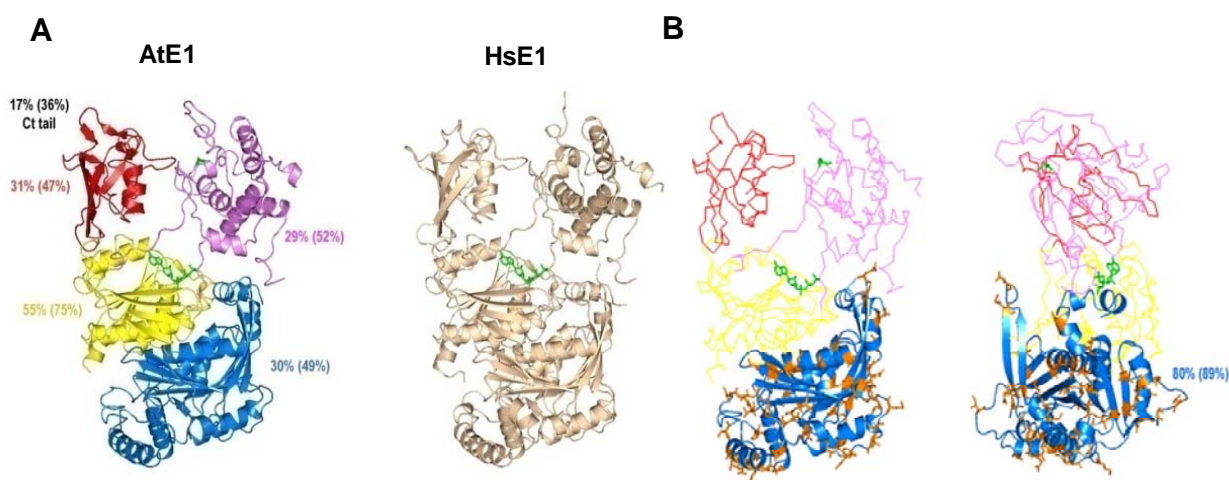


Fig. 9. Predicció de l'estructura de l'enzim activador de SUMO. (A) Estructura terciària de les formes humanes i d'*Arabidopsis* de l'heterodímer SAE1/SAE2. L'estructura de la forma humana de l'enzim activador està representat en color marró i en diferents colors la predicció per la forma d'*Arabidopsis*. AtSAE1 està representat en color blau i els diferents dominis d'AtSAE2 es representen en groc, rosa i vermell. En verd es representa l'ATP unit al domini d'adenilació (color groc) de la subunitat gran i al domini de color rosa (domini cisteïna catalítica), en verd es representa la cisteïna catalítica. En color vermell està representat el domini Ubl. Els números indiquen el percentatge d'identitat de seqüència aminoacídica dels diferents dominis entre la forma d'*Arabidopsis* i la forma humana. Els números entre parèntesi indiquen la similitud de seqüència d'aminoàcids entre les dos formes.

(B) Predicció de l'estructura de l'enzim activador de SUMO d'*Arabidopsis*. En color blau es representa la subunitat petita i en diferents colors es representen els diferents dominis de la subunitat gran, igual que en (A). Està representada la isoforma AtE1a d'*A. thaliana*. En la subunitat petita (AtSAE1a) venen representats en color marró els residus no conservats en la isoforma AtSAE1b. S'indica la identitat de seqüència d'aminoàcids i entre parèntesi la similitud entre les dues isoformes.

3 Localització subcel·lular de l'enzim activador (E1)

Les seqüències dels gens que conformen l'enzim activador d'*Arabidopsis*, els dos gens que codifiquen per a la subunitat petita, AtSAE1a i AtSAE1b, i el gen que codifica per a la subunitat gran, AtSAE2 es van amplificar per RT-PCR a partir de RNA de plàntules d'*Arabidopsis*. Posteriorment es van fusionar les diferents isoformes de la subunitat petita en el seu extrem C-terminal a la proteïna CFP (abreviatura en anglès de proteïna fluorescent blava). La subunitat gran es va fusionar en el seu extrem C-terminal a la proteïna YFP (abreviatura en anglès de proteïna fluorescent groga).

A més, es va fer una cerca de les seqüències aminoacídiques que indiquen una senyal de localització al nucli, NLS (*Nuclear Localization Signal*) a la seqüència d'AtSAE2. Es van trobar fins a 5 seqüències peptídiques candidates de senyals de localització al nucli, RRRP a la posició 257, RRPR a 258, .KRKK a 326, KKRR a 582 i PASKKRR a 579 (fig. 10).

Per comprovar la NLS responsable de la localització d'AtSAE2, es va fusionar la proteïna YFP a la regió truncada N-terminal d'AtSAE2 (AtSAE2 Δ Ct).

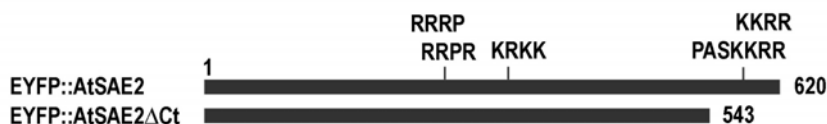


Fig. 10. Esquema de les construccions de AtSAE2 emprades a l'experiment d'expressió transitoria. Es fusiona la proteïna fluorescent groga a l'extrem N-terminal de la subunitat gran de l'enzim activador (AtSAE2). A l'esquema es representen diferents prediccions de seqüències de localització al nucli. En la part inferior esquema de la construcció creada amb el gen AtSae2 amb l'extrem C-terminal deletat (AtSAE2 Δ Ct).

Per tal d'estudiar la localització subcel·lular de les proteïnes AtSAE1a, AtSAE1b, AtSAE2 i AtSAE2 Δ Ct, es van transformar cèl·lules epidèrmiques de ceba (*Allium cepa*) per microbombardeig amb les construccions descrites anteriorment.

En aquest experiment es van cobombardejar la subunitat gran (AtSAE2) amb les dos combinacions de la subunitat petita (AtSAE1a i AtSAE1b). D'aquesta manera es pretenia aconseguir la reconstrucció de cadascun dels heterodímers AtE1.

A la figura 11 es mostra el patró de localització enconstrat en cada cas. Com era d'esperar, els controls efectuats amb la proteïna CFP i YFP, mostraven una distribució citosòlica i nuclear (fig. 11.A). La distribució nuclear d'aquestes està justificada per no superar la massa molecular definida per la mida d'exclusió dels porus presents en l'embolcall nuclear, difonent lliurement a través dels mateixos. A les cèl·lules transformades amb AtE1a (AtSAE2 + AtSAE1a) es va observar emissió de fluorescència deguda a la YFP únicament al nucli de la cèl·lula (fig. 11.B). D'aquesta observació es pot concloure que AtSAE2 presenta una localització nuclear. Respecte la fluorescència deguda a la CFP, localitzava principalment al nucli, encara que també s'observava senyal al citoplasma cel·lular (fig. 11.B). Aquest resultat suggereix que AtSAE1a co-localitza amb AtSAE2 al nucli, però també és present al citoplasma en absència de AtSAE2. En quant a les cèl·lules transformades amb AtE1b (AtSAE2 + AtSAE1b), es va detectar fluorescència únicament al nucli, tant de YFP com de CFP (fig. 11.B). D'aquí es conclou que AtSAE1b localitza al nucli, de la mateixa manera que AtSAE2.

Per últim, es van transformar cèl·lules amb la construcció YFP:SAE2 Δ Ct i CFP:SAE1A. En aquest cas s'observava fluorescència, tant de YFP com de CFP, per tota la cèl·lula (fig. 11.B). D'aquesta manera es demostra que la localització nuclear de AtSAE2 es deguda a la presència de la NLS situada a l'extrem C-terminal de la mateixa.

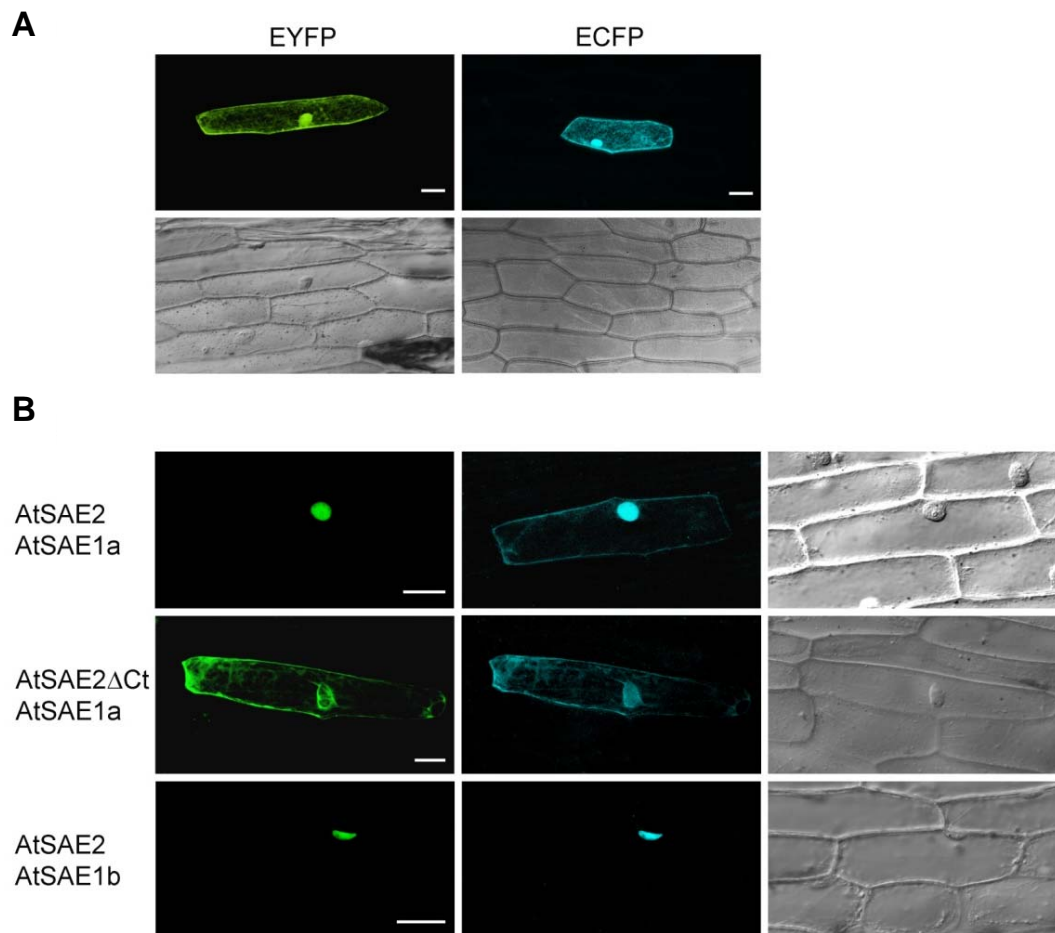


Fig. 11. Localització subcel·lular d'AtE1. Es van transformar transitòriament cèl·lules epidèrmiques de ceba amb vectors expressant les següents proteïnes fluorescentes: **(A)** YFP; CFP, **(B)** YFP:AtSAE2 + CFP:AtSAE1a; YFP:AtSAE2ΔCt + CFP:AtSAE1a; YFP:AtSAE2 + CFP:AtSAE1b. Les cèl·lules que expressaven la proteïna de fusió van ser analitzades mitjançant microscòpia làser confocal. La senyal provinent de YFP es representa en color verd i la senyal de CFP en color blau. La barra són 50 μm.

4 Caracterització *in vitro* dels components del sistema de sumoilació

Als resultats de localització subcel·lular de les dues isoformes de AtE1, es va observar que AtSAE1a localitza principalment al nucli, però també és present al citoplasma en absència de AtSAE2. Per contra, aquest fenomen no ocorre amb AtSAE1b. Amb aquests resultats es podria suggerir que AtSAE1a presenta una major

estabilitat que AtSAE1b. Per confirmar aquesta major estabilitat de AtSAE1a observada *in vivo*, es van dissenyar un experiment que van consistir en realitzar una expressió de les diferents subunitats de AtE1 en cèl·lules d' *E. coli* i analitzar els nivells de proteïna soluble en cadascun dels diferents cultius. De forma complementària, es va realitzar un test d'estabilitat *in vitro* mitjançant la inducció de la desnaturalització per calor de AtE1a i AtE1b i la seva monitorització per calorimetria diferencial de rastreig. D'aquesta manera analitzar si la isoforma AtE1a és més estable que AtE1b.

4.1 Test d'estabilitat de l'enzim AtE1 en *Escherichia coli*

Per realitzar aquestes anàlisis els gens AtSAE2, AtSAE1a i AtSAE1b van ser subclonats en els vectors d'expressió pET28a i pET15, transformant la soca d'*E. coli* BL21 amb cada plàsmid per separat i les combinacions pET28-AtSAE2 amb pET15-AtSAE1a i pET28-AtSAE2 amb pET15-AtSAE1b.

Es van créixer els cultius a 37°C i després d'induir l'expressió de les construccions esmentades anteriorment es van incubar els cultius a diferents temperatures, 20, 30 i 37°C. Posteriorment, es va fraccionar el producte d'aquests cultius en sobrenedant i pellet per al posterior anàlisi per gel SDS-PAGE (fig. 12).

En aquestes anàlisis es va observar que amb una incubació del cultiu a 37°C després de la inducció de l'expressió, no es detectava proteïna soluble en cap dels cultius que expressaven cada proteïna per separat. A temperatures menors d'incubació sí que s'observaren certes diferències. Una diferència notable es va observar al comparar l'expressió de les dues isoformes de la subunitat petita per separat (fig. 12.A). La isoforma AtSAE1a presentava majors nivells de proteïna soluble en incubacions del cultiu a 20 i 30°C que la isoforma AtSAE1b. Respecte la subunitat gran, AtSAE2, mostrava un comportament molt semblant al de AtSAE1a, presentava nivells de proteïna soluble, arribant a un òptim al incubar el cultiu a 30°C. En analitzar la coexpressió es va observar que els rendiments totals d'obtenció de proteïna recombinant disminueixen, però proporcionalment millorava la solubilitat d'ambdues subunitats en comparació amb l'expressió de cadascuna per separat, arribant a un

òptim d'expressió a 30°C (fig. 12.B). En aquest cas, al comparar la solubilitat de les diferents isoformes, continuava la tendència de la major solubilitat de la isoforma AtE1a respecte la isoforma AtE1b. D'aquesta manera, es confirmaven les observacions anteriors *in vivo* on AtE1a presenta una major estabilitat que AtE1b.

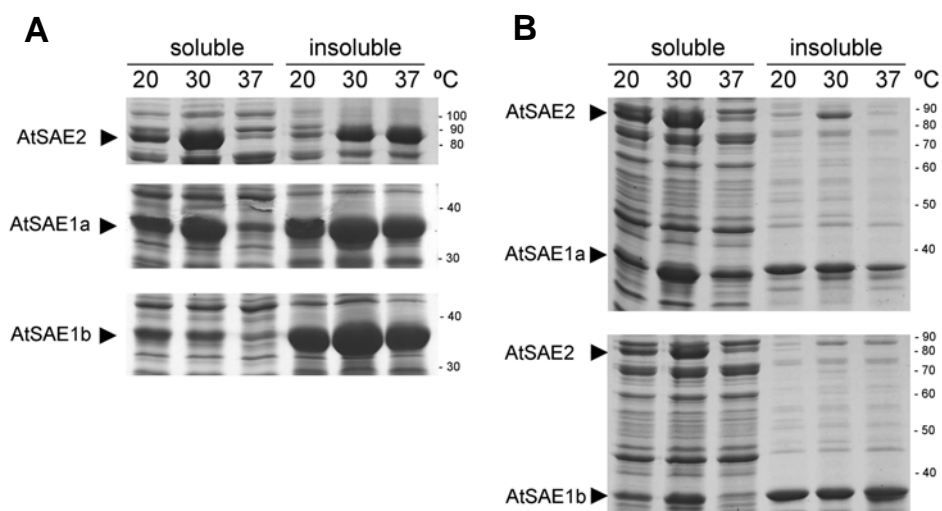


Fig. 12. Expressió heteròloga de les diferents subunitats de AtE1 a diferents temperatures. Anàlisi per cromatografia SDS-PAGE i tinció amb Coomassie de les proteïnes totals de l'expressió de les diferents subunitats de AtE1 per separat (A), i expressió de l'heterodímer (B). Tots els cultius són crescuts a 37°C i després de la inducció de l'expressió són incubats a les diferents temperatures indicades a la figura.

4.2 Anàlisi de l'estabilitat de AtE1 *in vitro*. Desnaturalització induïda per temperatura

Amb la major estabilitat de AtE1a observada *in vivo* i en l'expressió heteròloga en *E. coli*, es va realitzar una altra aproximació *in vitro*. Es van expressar i purificar les dues isoformes de l'enzim activador d'Arabidopsis, AtE1a i AtE1b i es va procedir a l'anàlisi de l'estabilitat d'aquestes *in vitro*. Aquesta aproximació es va realitzar mitjançant una desnaturalització de les proteïnes induïda per calor i la seva monitorització per calorimetria diferencial de rastreig. Amb aquesta tècnica es pot inferir que les

emissions de calor es deuen a la pèrdua de l'estructura quaternària i terciària de la proteïna (fig. 13).

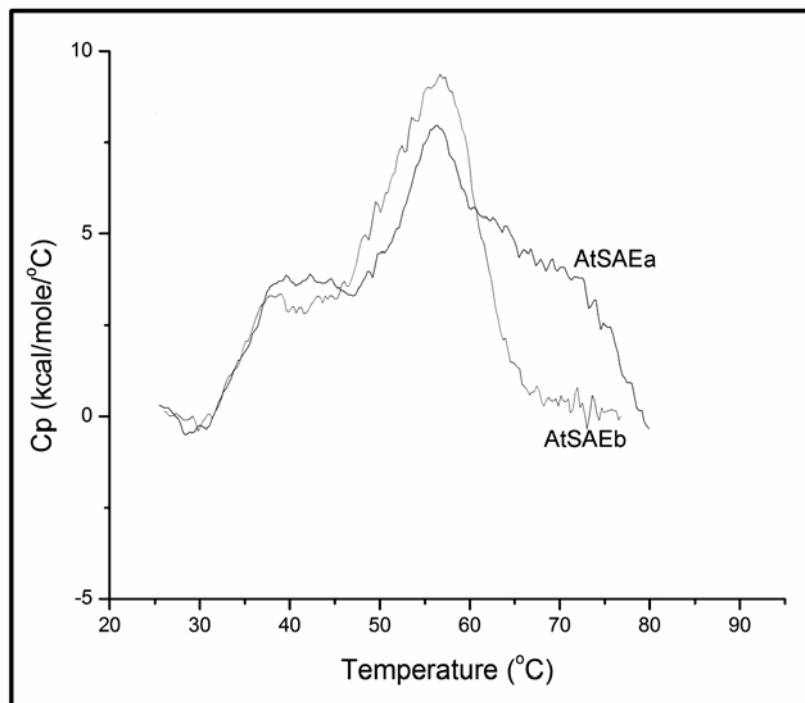


Fig. 13. Desnaturalització induïda per temperatura monitoritzada per calorimetria diferencial de rastreig de les dues isoformes de l'enzim activador de SUMO d'*A. thaliana*.

A la figura s'observa com a temperatures inferiors a 60°C les dues isoformes de l'heterodímer presentaven un comportament similar. Una diferència notable es va observar a temperatures més altes del sistema, on la isoforma AtSAEb retornava a l'energia basal ràpidament a una temperatura de 65°C. Per contra, el retorn a l'energia basal en la isoforma AtSAEa es produïa a temperatures més altes, fins a 80°C, i de manera més gradual. Aquest resultat corrobora la major estabilitat de la isoforma AtSAEa ja observada en els experiments anteriors.

4.3 Assaig de sumoilació *in vitro*

Es va procedir a una caracterització enzimàtica de les diferents isoformes dels components de la maquinària de sumoilació a *A. thaliana*. Aquesta caracterització es va portar a terme mitjançant assajos de sumoilació *in vitro*, els quals consistien en una incubació de la reacció on estaven presents l'enzim activador, l'enzim conjugador, SUMO, substrat acceptor i ATP. Com ja s'ha comentat a la introducció, la sumoilació pot donar-se *in vitro* sense la presència de lligases E3. Mitjançant aquests assajos es va poder analitzar com afecta la presència de les diferents isoformes de AtE1 en l'eficiència en la conjugació de SUMO. A més, aquest estudi també ens va permetre realitzar una comparació de la capacitat i eficiència de les diferents isoformes de AtSUMO de ser conjugades al substrat. Addicionalment, donat el paper de SUMO en les respostes a estrès per elevades temperatures, es van realitzar assajos a diferents temperatures d'incubació.

4.3.1 Expressió i purificació dels diferents components del sistema de sumoilació

En primer lloc, es van clonar per RT-PCR a partir de RNA total de plàntules d'*Arabidopsis* els diferents membres de la maquinària de sumoilació: les formes madures de les quatre isoformes de SUMO que s'expressen, AtSUMO1, 2, 3 i 5, les isoformes de l'enzim activador AtE1a i b, i l'enzim conjugador AtE2. Tots aquests cDNAs van ser clonats en vectors d'expressió i introduïts en cèl·lules d'*E.coli* BL21 per induir la seva expressió. A continuació es van purificar les diferents proteïnes recombinants mitjançant cromatografia d'afinitat per níquel. En el cas de l'enzim activador es va afegir un pas més de purificació consistent en una cromatografia de bescanvi aniònic.

Les proteïnes recombinants de les isoformes de AtSUMO1 i 2 van ser digerides amb la proteasa trombina per tal d'eliminar la cua d'histidines en l'extrem N-terminal (fig. 14.A). Com a substrat de SUMO s'ha utilitzat el domini C-terminal de la isoforma

3 de la catalasa d'*Arabidopsis* que conté un motiu de sumoilació. Aquest domini va ser expressat fusionat a la proteïna GST i va ser utilitzat com a molècula acceptora de SUMO als assajos *in vitro*. Aquesta proteïna recombinant va ser purificada per cromatografia d'afinitat, amb una columna d'agarosa-glutatió. Posteriorment es va afegir un segon pas de purificació consistent en una cromatografia d'exclusió molecular amb una columna Superdex 75. A la figura 14.B es mostra la proteïna purificada, anomenada a partir d'aquí GST-CAT.

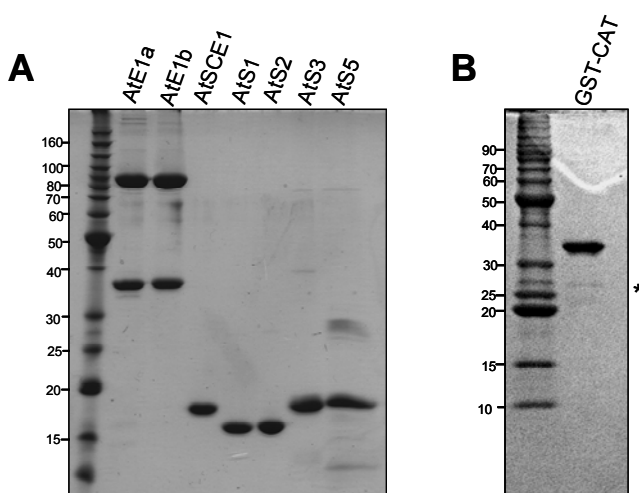


Fig. 14 Components dels assajos de sumoilació *in vitro* purificats. Tinció amb Coomassie de SDS-PAGE on es mostren els diferents components. (A) AtSAE1A, AtSAE1B, AtSCE1, AtSUMO1, AtSUMO2, AtSUMO3, AtSUMO5. Les isoformes AtSUMO1 i 2 van ser digerides amb la proteasa trombina per eliminar la cua d'histidines situada en l'extrem N-terminal. (B) Substrat de SUMO (GST-CAT). En asterisc s'assenyala la presència de proteïna GST.

4.3.2 Validació de GST-CAT com a substrat específic de SUMO

Per mutagènesi dirigida es va mutar la lisina 419 del substrat de SUMO, GST-CAT, per una alanina. Aquesta lisina és la que pertany a la seqüència consens de sumoilació del substrat. Per tant era d'esperar que aquest substrat (GST-CAT K419A) fos incapaç de ser sumoilat ja que no presentava el grup ϵ -amino de la lisina on SUMO hauria de ser unit.

El substrat de SUMO (GST-CAT K419A) va ser expressat en *E.coli* i posteriorment purificat per cromatografia d'afinitat a glutatió i columna d'exclusió molecular superdex75 (fig 15).

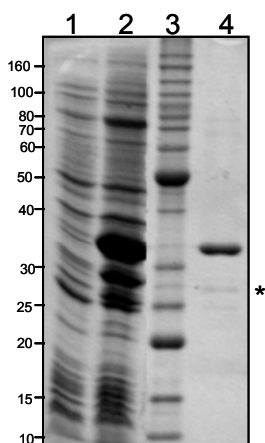


Fig. 15 Substrat de SUMO GST-CAT K419A. Carril 1: Proteïna total de cèl·lules provinents del cultiu sense induir l'expressió de la proteïna recombinant. Carril 2: Proteïna total de cèl·lules del cultiu induït amb IPTG. Carril 3: Marcador. Carril 4: Proteïna purificada per cromatografia d'afinitat a glutatió i posteriorment per cromatografia d'exclusió molecular. En asterisc s'assenyala la presència de la proteïna GST.

Als assajos sumoilació *in vitro* es va incubar la reacció on estaven presents l'enzim activador, l'enzim conjugador, SUMO, substrat acceptor i ATP. En aquests assajos les proteïnes SUMO (2 μ M), el substrat GST-CAT (5 μ M) i l'ATP (1 mM) estaven en excés, mentre que E1 i E2 estaven en concentracions limitants i equimolars (0.5 μ M). D'aquesta manera, el pas limitant de la reacció eren E1 i E2. Els productes de la reacció *in vitro* van ser analitzats mitjançant SDS-PAGE i immunodetecció amb anticòs anti-GST ja que el substrat està fusionat a la proteïna GST.

En aquests assajos es van realitzar diverses reaccions control (fig. 16). Aquestes reaccions van consistir en incubar la reacció en absència d'ATP i altra on es va substituir el substrat per la proteïna GST. En cap d'aquestes reaccions es va observar sumoilació del substrat. En canvi, al afegir ATP i el substrat GST-CAT es va observar com es produïa la sumoilació del substrat. Per contra, si el substrat present a la reacció contenia una substitució de la lisina 419 per una alanina, aquest era incapaç de ser sumoilat.

GST	-	+	+	-	-	-	-
GST-CAT	+	-	-	+	+	-	-
GSTCAT (K419A)	-	-	-	-	-	+	+
ATP	-	+	+	+	+	+	+
Temps (min)	60	15	60	15	60	15	60

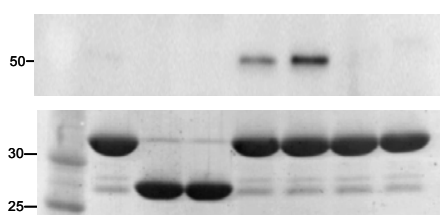


Fig. 16 Assaig de sumoilació *in vitro*. L'anàlisi de les reaccions es realitza per SDS-PAGE i immunodetecció amb anti-GST. E1a, E2, SUMO2 estaven presents a totes les reaccions, variant-ne el substrat, tal i com s'indica a la part superior de la figura. Les reaccions van ser incubades a 22°C. Cada reacció es analitza a dos temps, 15 i 60 minuts, excepte la reacció control sense ATP, on només s'analitza a temps 60 minuts. En la part inferior es mostra la banda corresponent al substrat en la tinció en Coomassie de la membrana, utilitzat per normalitzar la càrrega.

4.3.3 Anàlisi cinètic de la maquinària de sumoilació. Assaig de sumoilació *in vitro*

Mitjançant assajos de sumoilació *in vitro* es va analitzar la capacitat de les diferents isoformes de l'enzim activador de conjuguar SUMO a aquest substrat (GST-CAT). Es van realitzar assajos de sumoilació *in vitro* a diferents temperatures d'incubació. Addicionalment, en cada gel es carregava una quantitat coneguda de proteïna GST, d'aquesta manera es podia correlacionar la intensitat de senyal amb una quantitat de proteïna (fig. 17).

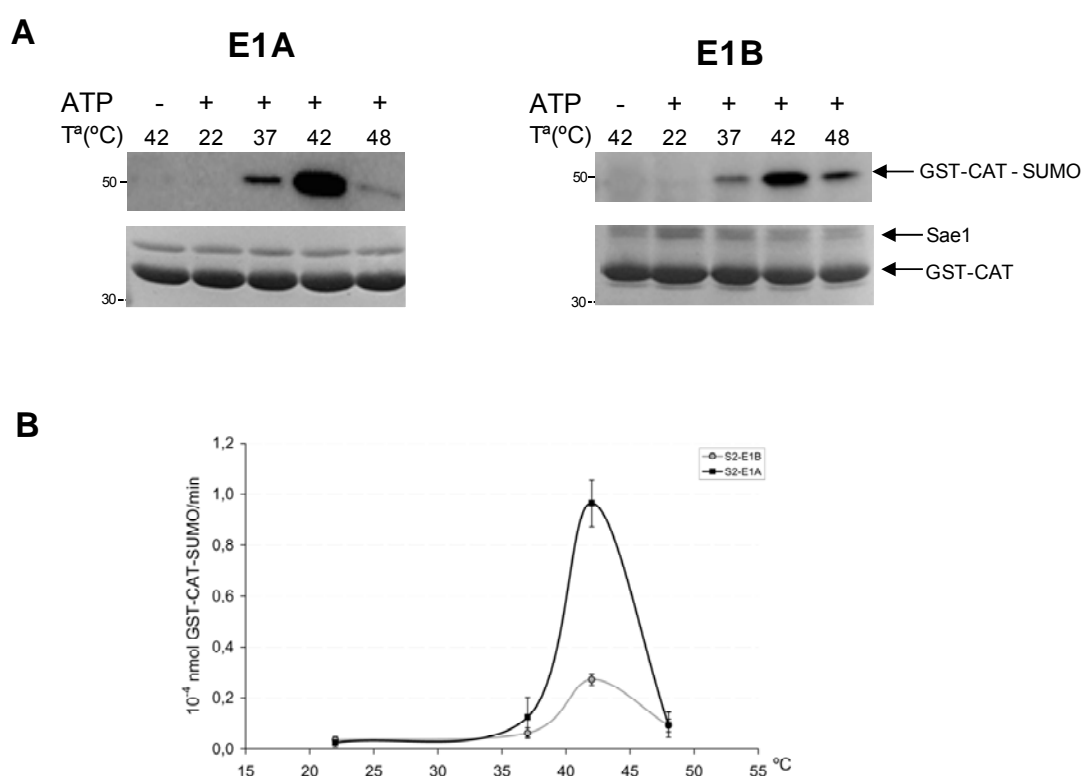


Fig. 17. Assaig sumoilació *in vitro* amb isoformes de AtE1a/b. (A) Les reaccions han estat incubades 10 minuts a la temperatura indicada en cada carril. L'anàlisi es realitza per *western blot* amb anticòs anti-GST. En la part inferior es mostra la tinció en Coomassie de la membrana, utilitzat per normalitzar la càrrega. (B) Corbes d'activitat de les dues isoformes d'E1. Valors expressats en nanomols de GST-CAT-SUMO produïts per minut. Es mostra la mitjana dels resultats obtinguts per quadruplicat i la seva corresponent desviació estàndard.

En aquest anàlisi, es va observar un comportament similar a les dues isoformes de l'enzim activador. Les dues isoformes augmentaven la seva capacitat de conjuguar SUMO a major temperatura, fins a un màxim de 42°C. Amb una incubació a 48°C

s'observava que la reacció ja deueia probablement degut a la inestabilitat de les diferents proteïnes presents a l'assaig. Una diferència notable entre les dos isoformes consistia en què AtE1a presentava una major capacitat de conjuguar SUMO al substrat que AtE1b, especialment a 42°C on AtE1a conjugava SUMO al substrat fins a 5 vegades més que AtE1b.

Per altra banda, també es va realitzar una caracterització de les diferents isoformes de SUMO mitjançant assajos de sumoilació *in vitro*. Es va analitzar la capacitat de les diferents isoformes de AtSUMO de ser conjugades al substrat GST-CAT. L'anàlisi del producte de les reaccions va ser igual al descrit anteriorment.

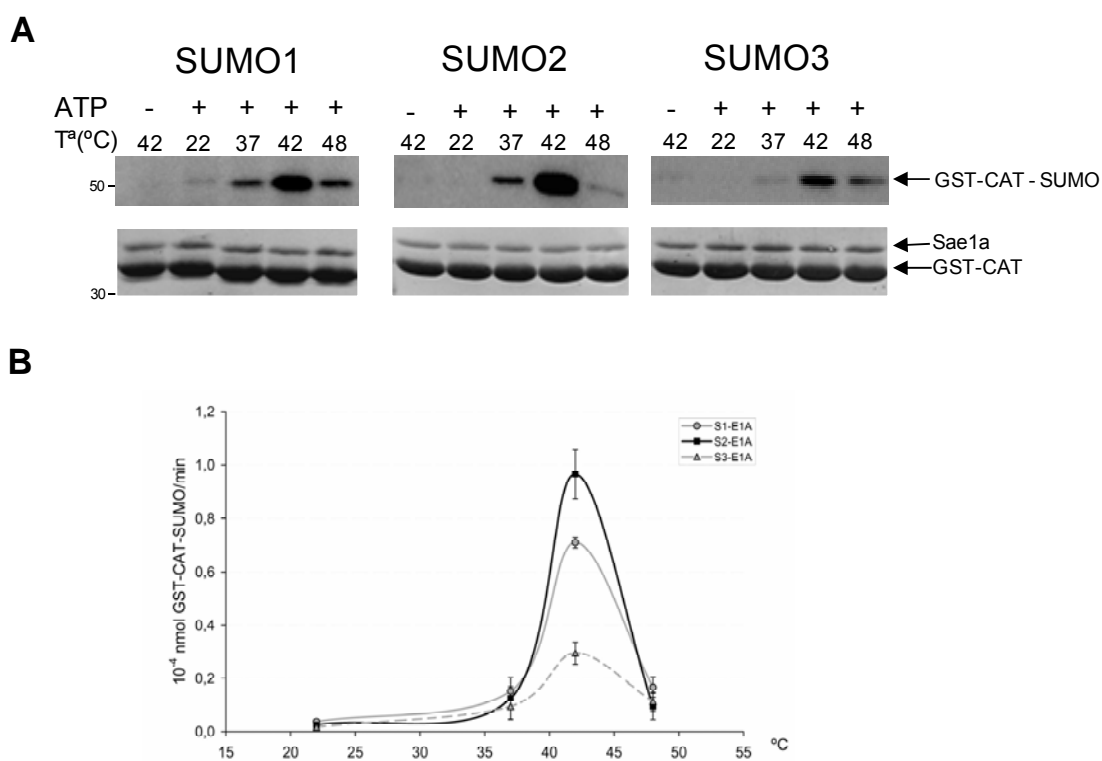


Fig. 18. Assaig sumoilació *in vitro* amb isoformes de AtSUMO. (A) Les reaccions han estat incubades 10 minuts a la temperatura indicada en cada carril. L'anàlisi es realitza per western blot amb anticòs anti-GST. En la part inferior es mostra la tinció en Coomassie de la membrana, utilitzat per normalitzar la càrrega. (B) Corbes d'activitat de les diverses isoformes de SUMO. Valors expressats en nanomols de GST-CAT-SUMO per minut. Es mostra la mitjana dels resultats obtinguts per quadruplicat i la seva corresponent desviació estàndard.

A la figura 18 es mostren els resultats obtinguts, les isoformes AtSUMO1, 2 i 3 presentaven el comportament descrit anteriorment, a major temperatura eren conjugats amb major eficiència. AtSUMO2 és la isoforma que presentava major eficiència en ser

conjugat al substrat, seguit de AtSUMO1 i per últim AtSUMO3. Les majors diferències s'observaren al incubar la reacció a 42°C, on es pot destacar la major eficiència en que era conjugat AtSUMO2, fins a 3 vegades més que AtSUMO3. La isoforma AtSUMO5 no era conjugada al substrat a cap de les temperatures assajades (resultats no mostrats). A la figura 18 es mostren els resultats obtinguts per als assajos amb la isoforma AtSAE1a. Amb la isoforma AtSAE1b també es van realitzar aquests assajos i els resultats obtinguts van ser similars però sempre amb una menor eficiència d'incorporació de SUMO al substrat.

5 Caracterització de la interacció no covalent AtSUMO-AtSCE

Entre SUMO i SCE es produeixen interaccions no covalents. A més, s'ha descrit l'estructura del complex SUMO-Ubc9 per cristal·lografia i revela una superfície d'interacció conservada entre E2 i diverses isoformes de SUMO tant de llevat com d'humans (Capili i Lima 2007).

Anteriorment, s'han realitzat estudis amb les isoformes AtSUMO1 i AtSUMO2 d'*Arabidopsis* amb l'enzim conjugador (Lois *et al.* 2003) on s'ha descrit que l'enzim conjugador d'*Arabidopsis* manté interaccions no covalents amb les isoformes AtSUMO1 i 2 i la isoforma humana HsSUMO1, però no amb l'ubiquitina (AtUbi). I al contrari ocorre amb l'enzim conjugador d'ubiquitina (AtUBC10), posant de manifest l'especificitat d'aquestes interaccions. Durant aquesta tesi s'han realitzat estudis mitjançant assajos de doble híbrid de llevat per veure si es produeixen aquestes interaccions no covalents entre la resta d'isoformes de SUMO d'*Arabidopsis* que s'ha detectat expressió, AtSUMO3 i AtSUMO5, i el seu enzim conjugador, AtSCE.

5.1 Interacció no covalent E2-SUMO. Assaig de doble híbrid

En primer lloc, es van subclonar les formes madures de AtSUMO3 i AtSUMO5 al vector pGADT7. Totes aquestes construccions van ser introduïdes en cèl·lules de la soca de *Saccharomyces cerevisiae* HF7c i seleccionades per auxotròfia per a leucina.

Per analitzar si AtSCE1 és capaç d'interaccionar amb AtSUMO3 o AtSUMO5 de forma no covalent, es van realitzar estudis de doble híbrid de llevat. En aquest experiment la capacitat de la soca de llevat HF7c per créixer en absència d'histidina es va utilitzar com a indicador d'interacció entre proteïnes. Es va trobar que la auxotròfia per a His no es va restaurar quan es va cotransformar AtSCE1 amb AtSUMO3 i AtSUMO5. Només es va recuperar la auxotròfia a les reaccions control, amb AtSCE1 i AtSUMO1 i en AtUBC10 i AtUbi (fig. 19). D'aquesta manera podem concloure que no es produeixen interaccions no covalents entre AtSUMO3 o AtSUMO5 i AtSCE1, tal i com es dona entre les isoformes AtSUMO1 i AtSUMO2 i AtSCE1 i entre la ubiquitina (AtUbi) i el seu enzim conjugador (AtUBC10).

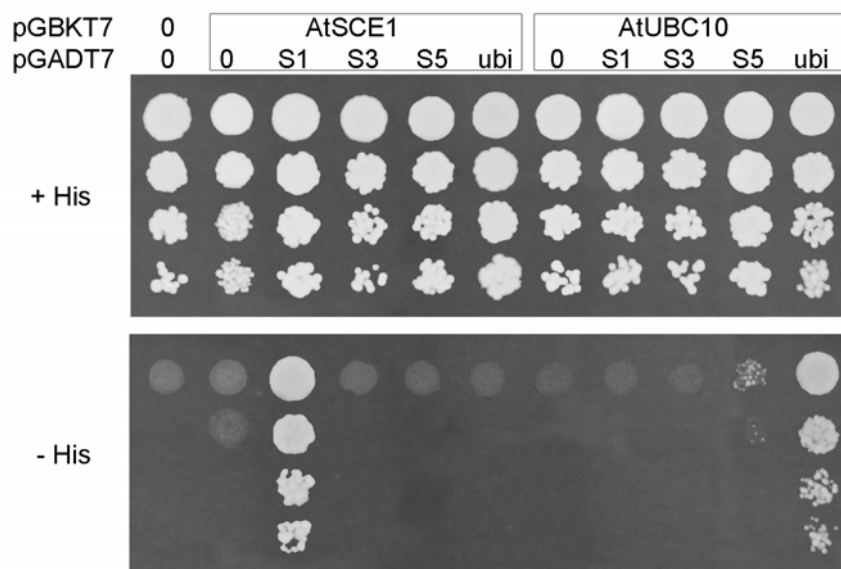


Fig. 19. Assaig de doble híbrid amb isoformes AtSUMO1, 2, 3 i 5, HsSUMO1 i AtUB1 amb AtSCE1 i AtUBC10. Cèl·lules de llevat HF7c van ser cotransformades amb plàsmids expressant GAL4BD-AtSCE1 o GAL4BD-AtUBC10 i GAL4AD sol (0) o fusionat a AtSUMO1 (S1), AtSUMO3 (S3), AtSUMO5 (S5) o AtUbiquitina (Ubi). Com a control negatiu, les cèl·lules van ser transformades amb plàsmids expressant GAL4BD i GAL4AD. L'habilitat per créixer en absència d'histidina indica interacció entre les proteïnes. Les plaques van ser incubades durant 2 dies a 30°C. 0 representa la no presència de cap gen fusionat a GAL4BD o GAL4AD.

5.2 Model d'estructura d'interacció no covalent AtSUMO-AtSCE

Basant-se en el model d'estructura per a la interacció de l'enzim conjugador i SUMO conservat en humans i en llevat (Capili i Lima 2007), s'ha realitzat una predicció d'aquesta estructura tridimensional amb les seqüències aminoacídiques d'*Arabidopsis* (fig. 20.A, B i C). S'ha descrit que hi ha residus importants que estableixen interaccions i mantenen la interacció entre SUMO i el seu enzim conjugador (fig. 20.D). A més, al comparar les seqüències de les isoformes de SUMO en aquestes posicions, es va observar l'existència de residus fortament conservats. Aquest grup de residus conservats el formen l'àcid glutàmic a la posició 79 i àcid aspàrtic en les posicions 82 i 85. També s'observaren diversos canvis en altres posicions, com per exemple a la posició 87, on hi havia una gran diversitat en el residu present en aquesta posició entre les diferents isoformes. On existeix una diferència que es conserva entre les isoformes de SUMO que mantenen interaccions amb AtSCE i les que no, és el residu de la posició 63. Aquesta diferència suposa un canvi dràstic ja que d'un àcid aspàrtic a AtSUMO1 i AtSUMO2 canviava a una asparagina a AtSUMO3 i AtSUMO5. En aquesta posició és dona un canvi de polaritat que pot comportar conseqüències a l'hora d'estabilitzar la interacció de AtSCE amb SUMO.

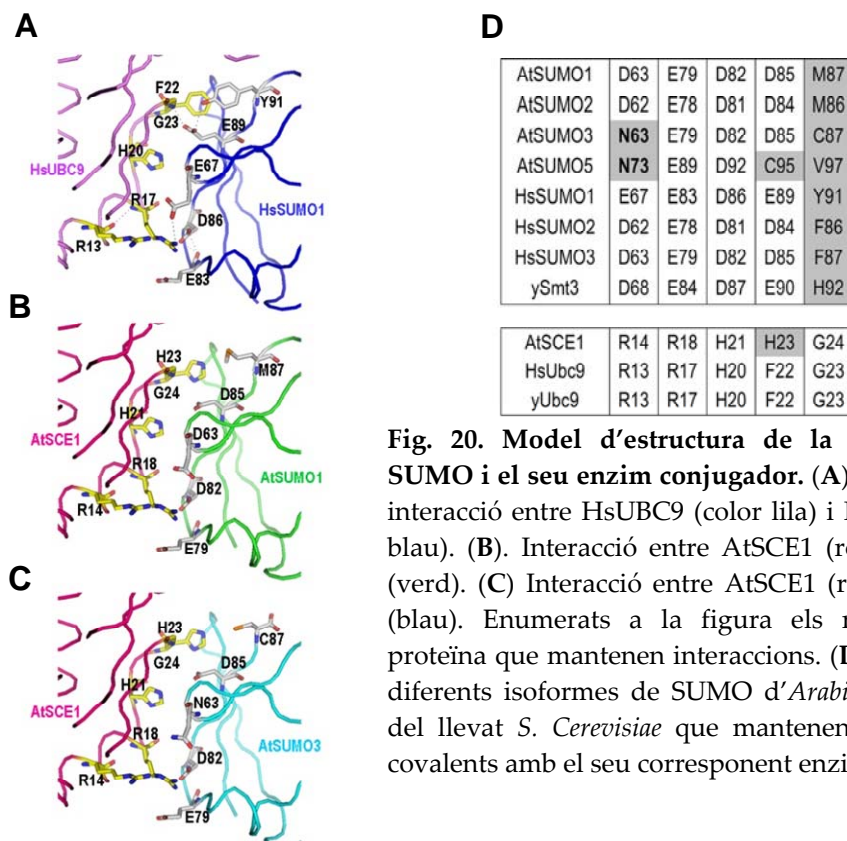


Fig. 20. Model d'estructura de la interacció entre SUMO i el seu enzim conjugador. (A) Primer pla de la interacció entre HsUBC9 (color lila) i HsSUMO1 (color blau). (B). Interacció entre AtSCE1 (rosa) i AtSUMO1 (verd). (C) Interacció entre AtSCE1 (rosa) i AtSUMO3 (blau). Enumerats a la figura els residus de cada proteïna que mantenen interaccions. (D) Residus de les diferents isoformes de SUMO d'*Arabidopsis*, humans i del llevat *S. Cerevisiae* que mantenen interaccions no covalents amb el seu corresponent enzim conjugador.

Capítol II. Estudi de la sumoilació com un mecanisme regulador essencial a *Arabidopsis*

Mitjançant anàlisis genètics de diversos mutants de la conjugació de SUMO realitzats en aquesta tesi s'ha demostrat que la sumoilació és un procés essencial per la viabilitat d'*A. thaliana*. Durant aquesta tesi s'han caracteritzat diversos mutants i plantes transgèniques amb la via de sumoilació alterada.

1 Caracterització de plantes mutants de la maquinària de sumoilació

Per ajudar a definir la importància de la sumoilació a plantes, es van buscar mutants d'inserció de T-DNA que afectessin la seqüència de E1 o E2. Es van obtenir un o més mutants amb els gens *AtSAE1a*, *AtSAE2* o *AtSCE1* interromputs de la col·lecció Salk SIGNAL generada amb un fons genètic *Columbia 0* (Alonso *et al.* 2003) (fig. 21.A). Per al gen *AtSAE1a* es va trobar una línia amb inserció de T-DNA entre el penúltim exó, 233 parells de bases seqüència a 5' del codó d'aturada. Aquesta línia es va anomenar *atsae1a.3* (Salk_060834). En el cas d'*AtSAE2* es va trobar una línia amb la inserció entre el quart intró (*atsae2.2*), seqüència a 5' del codó per a la cisteïna catalítica (Salk_053023). Per últim, a pesar de ser el gen més petit del grup, es van trobar dos línies amb inserció de T-DNA per al gen *AtSCE1*. Les dos línies contenen la inserció al inici de la seqüència d'aquest locus. *atsce1.5* (Salk_071596) i *atsce1.4* (Salk_138741) contenen la inserció molt prop del codó d'inici, *atsce1.5* al primer exó i *atsce1.4* al primer intró, 56 i 77 parells de bases a 3' d'aquest codó.

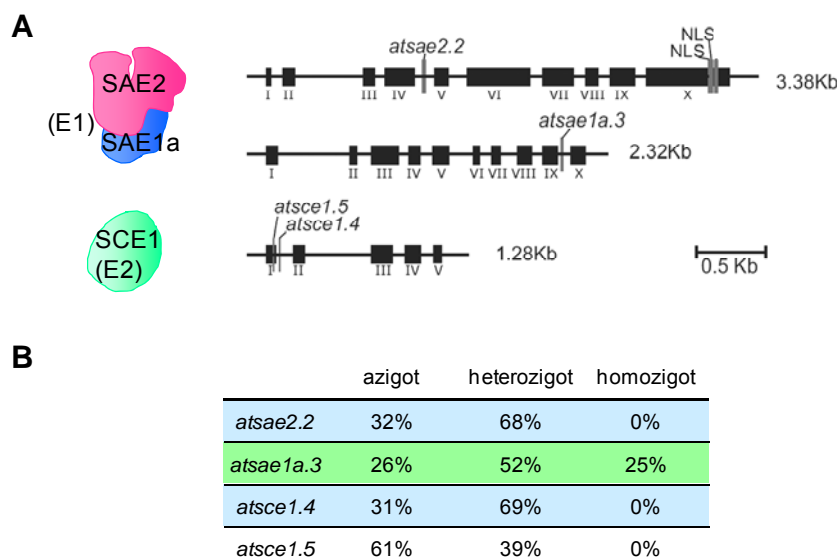


Fig. 21. **Mutants d'inserció de T-DNA de la maquinària de sumoilació.** (A) Diagrama de la localització de la inserció de T-DNA de les diferents línies mutants. Exons representats en requadres negres i introns en línies. El número de parells de bases de la regió genòmica representada que conté cada gen està indicat a la dreta. (B) Segregació de la descendència obtinguda per la autofecundació de línies heterozigotes de cada mutant analitzada per PCR de genòmic.

L'anàlisi dels mutants *atsae2.2* i *atsce1.4* van revelar que la via de conjugació de SUMO és essencial a *Arabidopsis*. Es van autofecundar línies heterozigotes de cada mutació i no es va poder trobar descendència homozigota al analitzar-la per PCR a partir de DNA genòmic (Fig. 21.B). En el cas de les línies mutants *atsae1a.3*, es van aconseguir plantes homozigotes per a la inserció. Aquestes plantes no van mostrar cap fenotip anormal en condicions de creixement estàndard d'hivernacle, suggerint que el gen AtSAE1a no és essencial per la viabilitat de la planta.

Posteriorment, es va realitzar un anàlisi a nivell molecular d'aquests mutants. Donada la impossibilitat d'aconseguir línies homozigotes per aquestes mutacions, es va treballar amb plantes heterozigotes. En analitzar per *western blot* amb anticòs anti-Sae2 extractes de proteïna total del mutant *atsae2.2* es va observar que aquest mostrava una clara reducció en la quantitat de proteïna SAE2 (fig. 22.A). Presentaven aproximadament un 30% menys de proteïna SAE2 que les plantes azigotes per aquesta mutació (fig. 22.C). En el cas dels mutants *atsce1.4* es va realitzar el mateix anàlisi i es va observar una reducció en la quantitat de proteïna SCE1 (fig. 22.A). Presentaven fins a tres vegades menys proteïna SCE1 que les plantes azigotes per aquesta mutació (fig.

22.C). Malgrat aquesta reducció en els nivells de proteïna de la maquinària de sumoilació, aquests mutants no presentaven una reducció significativa en nivells de conjugats de SUMO (fig. 22.B).

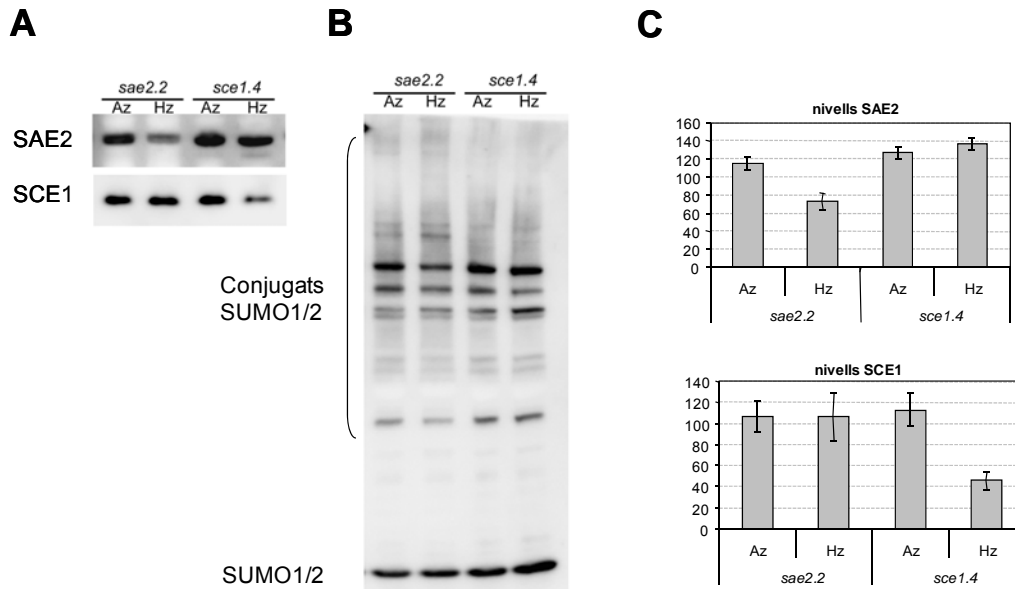


Fig. 22. Anàlisi molecular dels mutants de la maquinària de sumoilació.

(A) Anàlisi per *western blot* d'extractes de proteïna total de la part aèria de plantes de 4 setmanes azigotes i heterozigotes dels mutants *atsae2.2* i *atsce1.4*. Les proteïnes indicades en cada cas van ser identificades per immunoblot amb anticòs específic de cada proteïna.

(B) Anàlisi per *western blot* dels mateixos individus que en A. però en aquest cas la immunodetecció va ser realitzada amb anticòs anti-SUMO1 que reconeix les isoformes AtSUMO1 i AtSUMO2. En la part inferior s'observa el SUMO lliure i en la part superior els diferents conjugats de AtSUMO1/2.

(C) Quantificació dels nivells de proteïna analitzades en (A). En la part superior s'analitzen els nivells de SAE2 i en la part inferior els nivells de SCE1. Es representen els valors d'intensitat obtinguts per cada banda en l'anàlisi per *western blot*.

1.1. Anàlisi de les plantes mutants *atsae1a.3*

Es va analitzar el nivell de conjugats de SUMO que presentaven les plantes mutants *atsae1a.3*, que com ja s'ha comentat a l'apartat anterior, no mostraven cap fenotip anormal en condicions de creixement estàndard d'hivernacle. Es van sotmetre les plantes a diferents tipus d'estrès abiòtic, situacions on les plantes requereixen una maquinària de conjugació de SUMO molt activa.

En primer lloc, les plantes van ser sotmeses a un estrès per altes temperatures i es va analitzar el seu nivell de conjugats de SUMO (fig. 23). A la figura s'observa com el nivell basal de conjugats, abans de l'aplicació del xoc tèrmic, era similar en plantes azigotes i homozigotes per aquesta mutació. Després de l'exposició a la situació d'estrès s'observava com els nivells de conjugats de SUMO augmentaven, però aquest augment era molt més dramàtic en plantes azigotes. Les dues línies de plantes homozigotes per a la mutació presentaven el mateix comportament, no acumulaven tants conjugats de SUMO, suggerint que la manca de AtSAE1a condicionava a la planta i no era capaç d'acumular el mateix nivell de conjugats de SUMO que les plantes azigotes per la mutació.

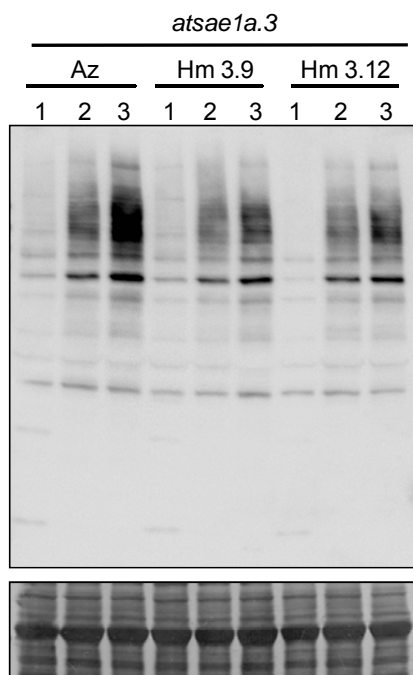


Fig. 23. Nivells de sumoilació en plantes *atsae1a.3* mutants sotmeses a estrès tèrmic. Extractes de proteïna total de plàntules azigotes i homozigotes per a la mutació *atsae1a.1* de 10 dies d'edat cultivades a dia llarg en medi Gamborg B5. Plantes sotmeses a una incubació de 30 minuts a una temperatura de 22°C (1), 42°C (2) o 42°C més una recuperació de 30 minuts a 22°C (3). Els conjugats de SUMO endògens van ser detectats per anàlisi *western blot* amb anticòs policlonal anti-SUMO. A la part inferior es mostra la tinció amb Coomassie de la subunitat gran de la RuBisCO (55kDa) utilitzat com a control de càrrega. Cada carril conté 18 µg de proteïna.

Posteriorment, es van sotmetre aquestes plantes mutants *atsae1a.3* a una situació d'estrès per deshidratació (fig. 24). A la figura es pot observar com aquesta situació d'estrès també provocava una acumulació de conjugats de SUMO a la planta. En aquest cas, el comportament de les plantes homozigotes per a la mutació era el mateix que el descrit anteriorment en l'estrès tèrmic, no acumulaven tants conjugats de SUMO com les plantes azigotes per aquesta mutació.

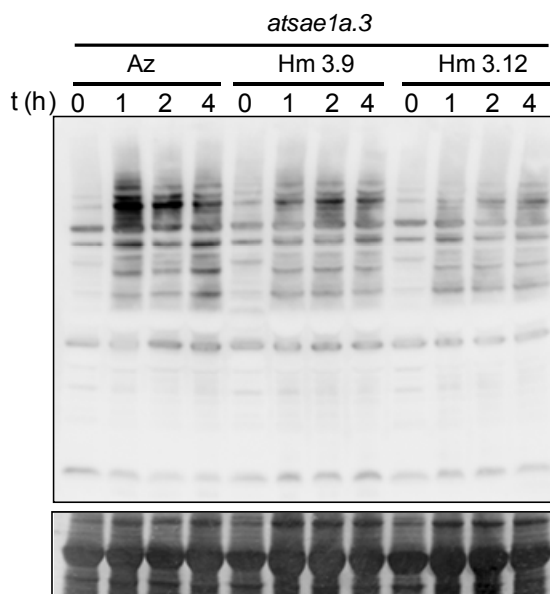


Fig. 24. Nivells de sumoilació en plantes *atsae1a.3* mutants sotmeses a estrès hídric. Extractes de proteïna total de plàntules azigotes i homozigotes per a la mutació *atsae1a.1* de 16 dies d'edat cultivades a dia llarg en medi sòlid MS. Es separa la roseta de la resta de la planta i es col·loca en una campana de flux laminar durant 0, 1, 2 i 4 hores. Els conjugats de SUMO endògens van ser detectats per anàlisi *western blot* amb anticòs policlonal anti-SUMO. A la part inferior es mostra la tinció amb Coomassie de la subunitat gran de la RuBisCO (55kDa) utilitzat com a control de càrrega. Cada carril conté 18 µg de proteïna.

2 El domini E1 Ubl és essencial per a la conjugació de SUMO

S'ha descrit un mecanisme d'activació de SUMO i la transferència del mateix des de E1 a E2 en sistemes mamífers (Lois i Lima 2005). Seguidament a l'activació de SUMO, es produeix una transesterificació i SUMO es transferit des de E1 a la cisteïna catalítica de SCE. En aquest pas de transferència de tioèster, SCE és reconegut per la subunitat gran de E1, concretament pel domini SAE2 Ubl.

Per analitzar la conservació d'aquest mecanisme al nostre organisme model, és va expressar l'enzim AtE1 amb el domini Ubl deletat a *E.coli* per la seva posterior purificació i mitjançant assajos *in vitro*, comprovar si amb aquest enzim SUMO era capaç de ser conjugat al substrat.

2.1 Expressió i purificació de AtE1ΔUbl

Per reacció de PCR i a partir de la construcció pET28-AtSAE2, descrita en R4.1.1, es va amplificar AtSAE2 amb els corresponents encebadors per generar la seqüència d'aquest gen amb el domini Ubl i l'extrem carboxi terminal deletat (AtE1ΔUbl).

Posteriorment es va expressar la proteïna en cèl·lules d'*E.coli* i va ser purificada mitjançant cromatografia d'afinitat a níquel (fig. 25.A). Les fraccions obtingudes van ser sotmeses a un segon pas de purificació consistent en una cromatografia de bescanvi aniónic (fig. 25.B).

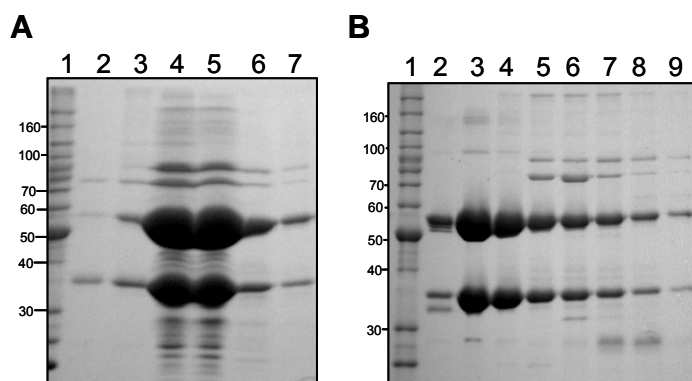


Fig. 25. Purificació de AtE1ΔUbl resolta en cromatografia SDS-PAGE. (A) La proteïna va ser purificada amb cromatografia d'afinitat de metall (Ni-NTA). Carril 1: Marcador, carril 2 al 6: diferents fraccions de l'eluit de la columna. (B) Fraccions de la purificació per cromatografia de bescanvi aniónic de la proteïna purificada en (A). Carril 1: marcador, carrils del 2 al 8 les diverses fraccions de la proteïna eluïda.

2.2 Assaig de sumoilació *in vitro* amb AtE1ΔUbl

Posteriorment a la purificació de la proteïna AtE1ΔUbl es va procedir a la seva caracterització. Mitjançant assajos de sumoilació *in vitro* es va analitzar si aquesta forma de l'enzim activador, amb el domini Ubl deletionat, era capaç de transferir SUMO a E2 i aquest al substrat GST-CAT. La realització de l'assaig va ser igual al descrit en l'apartat R4.3.3, es va realitzar una incubació de la reacció de 10 minuts a 42°C on estaven presents AtE1, AtE2, AtSUMO2 i el substrat acceptor de SUMO, GST-CAT (fig. 26). Es van incloure dos reaccions control, un control negatiu sense ATP on no es va observar cap conjugació de SUMO. L'altra reacció va consistir en un control positiu, on estaven presents tots els components de la maquinària de SUMO en la seva forma completa. En aquesta reacció s'observava l'aparició de la banda corresponent a SUMO unit a GST-CAT. En una tercera reacció, es va substituir l'enzim AtE1 per la seva forma amb el domini Ubl deletionat (AtE1ΔUbl). En analitzar aquesta reacció no

es produïa sumoilació del substrat GST-CAT, per tant podem concloure que el domini Ubl és essencial per la conjugació de SUMO a *Arabidopsis*.

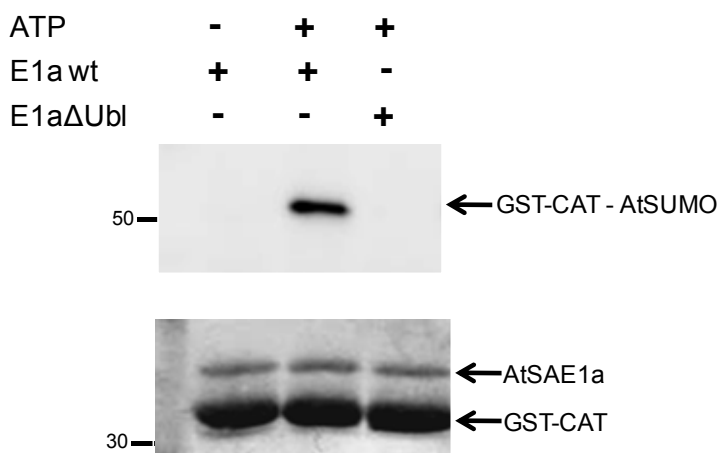


Fig. 26 Assaig de sumoilació *in vitro* amb AtE1ΔUbl. L'anàlisi de les reaccions es realitza per SDS-PAGE i immunodetecció amb anti-GST. E2, SUMO2 i GST-CAT estaven presents a totes les reaccions, variant-ne l'E1, tal i com s'indica a la part superior de la figura. Les reaccions han estat incubades 10 minuts a una temperatura de 42°C. En la part inferior es mostra la tinció en Coomassie del substrat, utilitzat per normalitzar la càrrega.

3 Estratègia per reduir els nivells de sumoilació a plantes:

Expressió del domini AtE1 Ubl

La sumoilació és un mecanisme essencial a *Arabidopsis*. Per aquesta raó, no es poden obtenir mutants homozigots dels components de la maquinària de sumoilació. A més, s'ha observat que plantes heterozigotes per aquestes mutacions no tenen els nivells de conjugats de SUMO significativament reduïts (fig. 22). Donats aquests condicionants, es va dissenyar una estratègia per reduir els nivells de conjugats de SUMO en planta per aprofundir en el coneixement de les funcions que SUMO exerceix a *Arabidopsis*. Aquesta estratègia va consistir en la creació d'un dominant negatiu, el qual consisteix en l'expressió del domini AtE1 Ubl amb la finalitat d'interferir en la interacció AtE1-AtE2 i com a conseqüència disminuir l'eficiència de conjugació de SUMO a la planta (fig. 27).

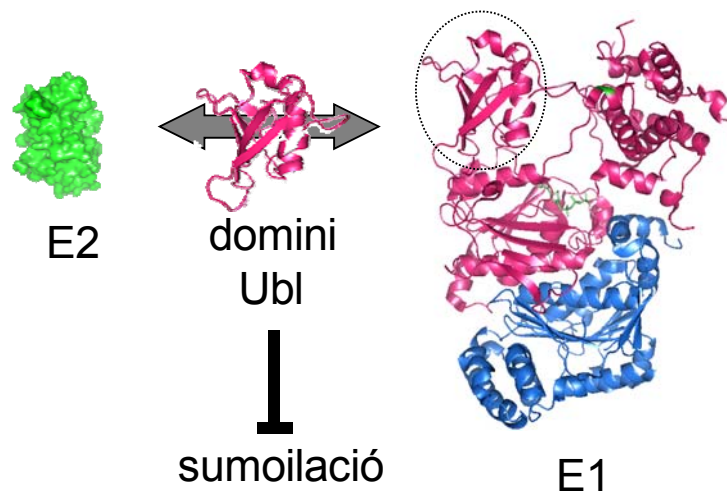


Fig. 27. Esquema de les interaccions del dominant negatiu. Al sobreexpressar el domini AtE1 Ubl s'interfereix en la interacció AtE1-AtE2 i d'aquesta manera disminueix els nivells de sumoilació en planta.

3.1 Validació de l'estratègia

L'objectiu de l'estratègia del dominant negatiu era aconseguir una disminució en els nivells de conjugats de SUMO en planta. Per validar aquesta estratègia es van realitzar dues aproximacions. La primera va consistir en experiments d'expressió transitoria en cèl·lules de ceba per comprovar la interacció entre el domini AtE1 Ubl i l'enzim AtE2 *in vivo*. Posteriorment, es va realitzar la segona aproximació mitjançant assajos de sumoilació *in vitro* per comprovar si la presència del domini Ubl interfereix en la reacció de sumoilació *in vitro*.

3.1.1 Interacció entre el domini AtE1 Ubl i l'enzim AtSCE1. Expressió transitoria CFP-AtE2 i YFP-Ubl

Les seqüències dels gens que codifiquen per a AtSCE1 i la seqüència que codifica per al domini Ubl més la cua C-terminal (Ubl+Ct) de l'enzim AtE1 es van subclonar als vectors pWEN25 i pWEN15 respectivament. D'aquesta manera es va fusionar la

proteïna CFP a l'extrem amino terminal de AtSCE1 i la proteïna YFP a l'extrem amino terminal del domini AtE1 Ubl.

Per analitzar la localització subcel·lular i si es produïa una interacció entre aquestes proteïnes *in vivo*, es van transformar cèl·lules epidèrmiques de ceba per microbombardeig amb les construccions descrites anteriorment. En aquest experiment es van bombardejar les dues construccions per separat i en una tercera mostra es van cobombardejar les dues construccions.

A la figura 28 es mostra el patró de localització encontrat en cada cas. Com era d'esperar, els controls efectuats amb la proteïna CFP i YFP, mostraven una distribució citosòlica i nuclear (fig. 28.A). A les cèl·lules transformades amb YFP-Ubl+Ct es va observar emissió de fluorescència únicament al nucli de la cèl·lula (fig. 28B). Aquesta localització era deguda a que aquesta construcció s'ha realitzat amb el domini Ubl més l'extrem carboxi terminal que conté una seqüència de localització al nucli, tal i com ja s'ha descrit anteriorment (fig. 10). Respecte les cèl·lules transformades amb la construcció CFP-AtE2, s'observava fluorescència principalment al nucli, encara que també s'observava senyal al citoplasma (fig. 28.B). Aquest resultat suggereix que AtE2 presentava principalment una localització nuclear i en menor grau citoplasmàtica tal i com ja s'havia descrit anteriorment en altres treballs (Lois *et al.* 2003). Quan es van cotransformar cèl·lules amb CFP-AtE2 i YFP-Ubl+Ct, es va observar que ambdues proteïnes colocalitzaven al nucli (fig. 28.C). A més ja no s'observava senyal deguda a la CFP al citoplasma, AtE2 deixava de localitzar al citoplasma. Aquests resultats suggerien que el domini Ubl està interaccionant i realitzant aquest efecte de segrest de AtSCE1 *in vivo*.

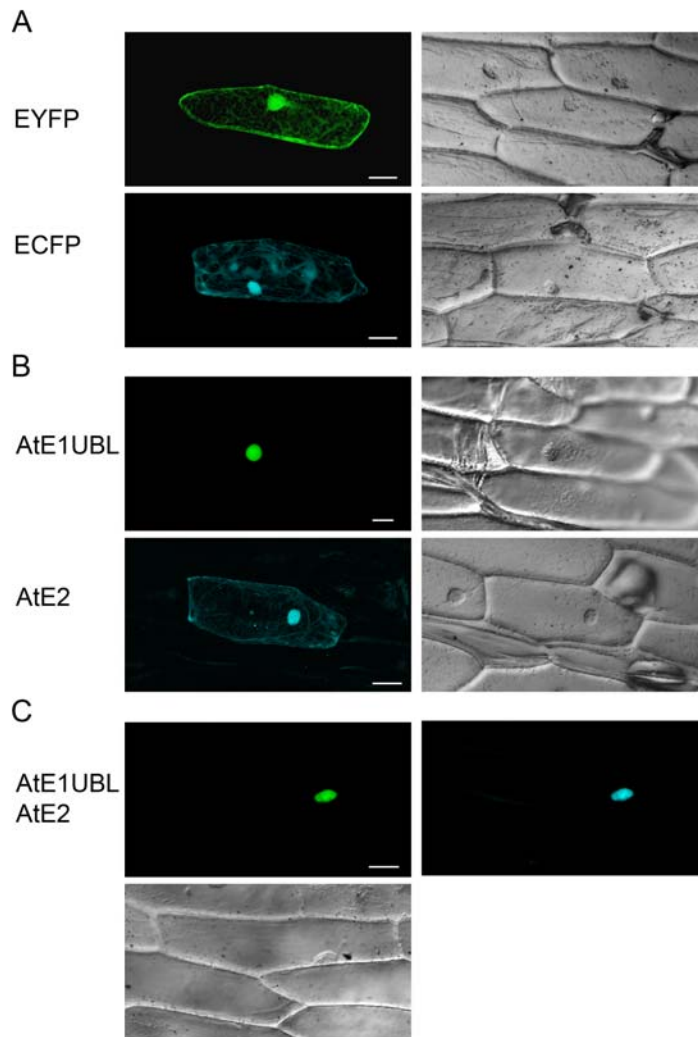


Fig. 28 Localització subcel·lular de AtSCE1 i del domini Ubl de AtE1. Es van transformar transitòriament cèl·lules epidèrmiques de ceba amb vectors expressant les següents proteïnes fluorescentes: YFP i CFP (**A**), YFP:AtE1Ubl i CFP:AtE2 (**B**), YFP:AtE1Ubl + CFP:AtE2 (**C**). Les cèl·lules que expressaven la proteïna quimèrica de fusió van ser analitzades mitjançant microscòpia laser confocal. La senyal provinent de YFP està representada en color groc i la senyal de CFP en color blau. La barra són 50 μm .

3.1.2 El domini Ubl disminueix l'eficiència de la sumoilació *in vitro*

La segona aproximació per validar l'estratègia va consistir en analitzar si la presència del domini Ubl interferia en la reacció de conjugació de SUMO *in vitro*. En primer lloc, per reacció de PCR i a partir de la construcció pET28-AtSAE2, es va amplificar el domini Ubl i l'extrem carboxi terminal (Ubl+Ct) de AtSAE2. Aquest fragment es va subclonar al vector

pET28 per posteriorment expressar la proteïna en cèl·lules *E.coli* i purificar-la mitjançant cromatografia d'afinitat a níquel (fig. 29).

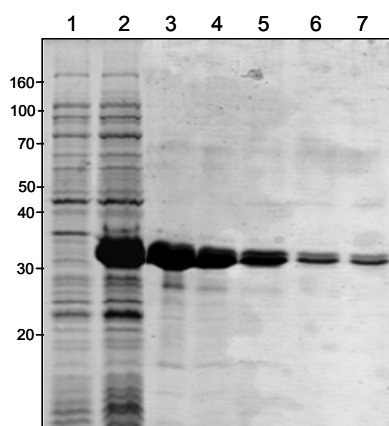


Fig. 29. Purificació del domini Ubl+Ct resolta en cromatografia SDS-PAGE. (A) La proteïna va ser purificada amb cromatografia d'afinitat de metall (Ni-NTA). Carril 1: proteïna total de cèl·lules provinents del cultiu sense induir l'expressió de la proteïna recombinant. Carril 2: proteïna total de cèl·lules del cultiu induït amb IPTG. Carril 3 al 8: diverses fraccions de la purificació:

Posteriorment es van realitzar assajos de sumoilació *in vitro* on estaven presents AtE1, AtE2, AtSUMO, GST-CAT més el domini AtE1 Ubl+Ct a diferents concentracions. Es va realitzar una incubació de la reacció de 10 minuts a 42°C on estaven presents AtE1, AtE2, AtSUMO2, el substrat acceptor de SUMO GST-CAT i concentracions creixents del domini Ubl+Ct (fig. 30.A). A la figura s'observa com al augmentar la concentració del domini Ubl+Ct, la conjugació de SUMO al substrat disminuïa. Addicionalment, en cada gel es va carregar una quantitat coneguda de proteïna GST, d'aquesta manera es podia correlacionar la intensitat de senyal amb una quantitat de proteïna (fig. 30.B). Amb la presència del domini Ubl+Ct (1 μ M) al doble de la concentració que AtE1 i AtE2 a l'assaig, s'observava una reducció del 20% de la sumoilació. Si la concentració d'Ubl+Ct (4 μ M) era vuit vegades superior que AtE1 i AtE2, la sumoilació es reduïa fins a la meitat. Amb concentracions majors del domini Ubl+Ct (10 μ M), fins a 20 vegades superior als enzims de la maquinària, la sumoilació es veia reduïda un 90%.

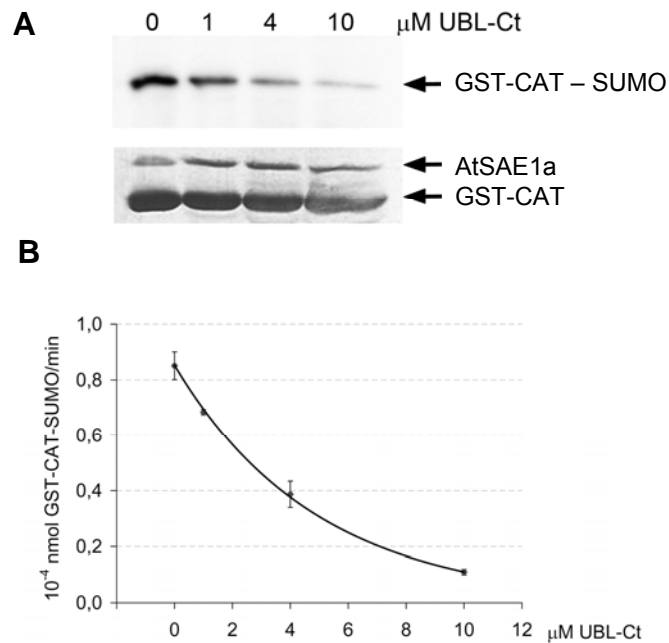


Fig. 30. Assaig de sumoilació in vitro amb la presència del domini Ubl. **A.** En cada reacció estan presents AtE1a, AtE2, AtSUMO2, GST-CAT i el domini Ubl a la concentració indicada en cada carril. Les reaccions han estat incubades 10 minuts a 42°C. L'anàlisi es realitza per cromatografia SDS-PAGE i immunodetecció amb anticòs anti-GST. En la part inferior es mostra la tinció en Coomassie del substrat i de SAE2, utilitzat per normalitzar la càrrega. **B.** Corbes de conjugació de SUMO al substrat en funció de la presència del domini Ubl. Valors expressats en nanograms de proteïna corresponents a la banda SUMO unit al substrat.

3.2 Plantes transgèniques expressores del domini AtE1 Ubl

Un cop validada l'estratègia al comprovar que el domini Ubl disminuïa l'eficiència de conjugació de SUMO *in vitro* i que el domini Ubl interaccionava amb E2 *in vivo*, es van generar plantes transgèniques expressores d'aquest domini AtE1 Ubl.

La seqüència que codifica per al domini Ubl més l'extrem carboxi-terminal va ser clonat al vector pBA002 i introduït en cèl·lules d'*Agrobacterium tumefaciens* C1C58. Posteriorment es van transformar plantes d'*Arabidopsis* obtenint plantes transgèniques d'expressió del domini AtE1 Ubl.

3.2.1 Caracterització fenotípica i molecular de les plantes transgèniques

Es van aconseguir diferents línies que expressaven el domini AtE1 Ubl+Ct. Aquestes línies presentaven una gran diversitat en quant a nivells d'expressió del domini Ubl. Es van seleccionar diferents individus descendents de la primera línia que es va obtenir per la seva caracterització que mostraven una segregació 100% resistent (Ubl+Ct 1.4 i 1.7).

En primer lloc es van analitzar els nivells d'expressió del domini AtE1 Ubl de les diferents plantes transgèniques (fig. 31.C). Com es pot observar, les plantes transgèniques seleccionades per a la seva caracterització presentaven nivells d'expressió diferents, les plantes Ubl+Ct 1.7 presentaven una menor expressió que les plantes Ubl+Ct 1.4.

La caracterització fenotípica d'aquestes plantes transgèniques es va realitzar per comparació amb plantes silvestres *Col-0*. Es va observar que les plantes transgèniques presentaven un lleuger nanisme (fig. 31.A) i una floració primerenca en règim de llum de dia llarg (fig. 31.B). Es va monitoritzar el nombre de fulles presents a la roseta al moment de floració, i es van observar diferències entre les plantes que expressen el domini AtE1 Ubl i les plantes silvestres. Les plantes transgèniques florien de mitjana, amb dues fulles de roseta menys que *Col-0*.

A banda d'aquest paràmetre, també es va calcular la superfície que ocupa la roseta d'aquestes plantes de 6 setmanes d'edat cultivades en règim de llum de dia curt. Es va observar que les plantes transgèniques presentaven una roseta més petita, ocupaven de mitjana la meitat de superfície que ocupava la roseta de plantes silvestres de la mateixa edat i cultivades en les mateixes condicions (fig. 31.D i 31.E). A més, entre les diferents plantes transgèniques, hi ha una correlació entre el fenotip i els nivells d'expressió del domini AtE1 Ubl. Els individus Ubl+Ct 1.4 mostraven un fenotip més sever que les plantes Ubl+Ct 1.7, presentaven una roseta més petita i un menor número de fulles al moment de floració (fig. 31).

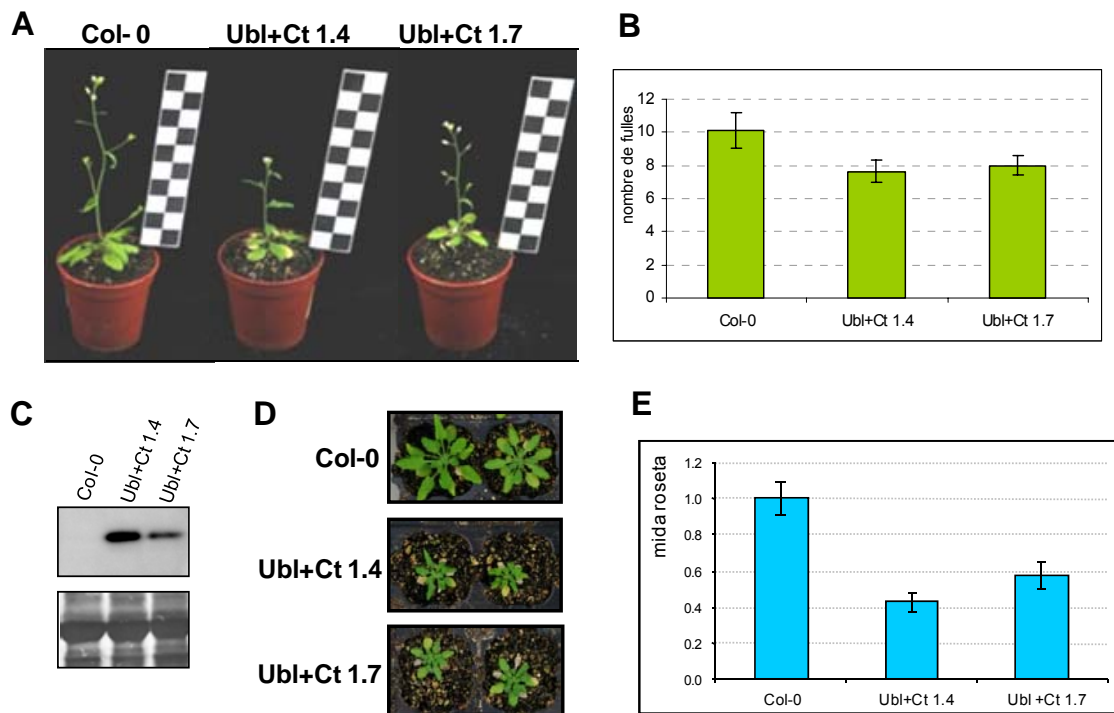


Fig. 31. Anàlisi fenotípic de les plantes transgèniques. **A.** Plantes de 3 setmanes d'edat cultivades a terra en règim de dia llarg. Es mostren dos plantes transgèniques i plantes *Col-0*. S'observa el lleuger nanisme de les plantes transgèniques en comparació amb *Col-0*. **B.** Nombre de fulles presents a la roseta al moment de floració. Les plantes transgèniques floreixen amb 7.64 ± 0.67 i 8 ± 0.6 fulles de roseta, en comparació amb plantes *Col-0* que floreixen amb 10.14 ± 1.07 fulles de roseta ($n=12$). **C.** Anàlisi de les mateixes plantes que en **A.** per a l'expressió del domini AtE1 Ubl. Anàlisi per *western blot* amb anticòs policlonal anti-SAE2. A la part inferior es mostra la tinció amb Coomassie de la subunitat gran de la RuBisCO (55kDa) utilitzat com a control de càrrega. Cada carril conté $18 \mu\text{g}$ de proteïna total. **D.** Plantes *Col-0* i diferents plantes transgèniques cultivades durant 6 setmanes en règim de dia curt. **E.** Superfície que ocupa la roseta de les plantes transgèniques respecte la roseta de plantes *Col-0*.

Actualment les noves línies de plantes expressores del domini AtE1 Ubl s'estan caracteritzant i presenten el mateix fenotip de nanisme i floració primerenca en règim de dia llarg (fig. 32). A més, en aquestes noves línies, continua observant-se la correlació entre aquest fenotip i els nivells d'expressió del domini AtE1 Ubl. Els descendents 1, 2, 6 i 4 de la línia 28.6 són els que presenten uns majors nivells d'expressió (fig. 32.B) i el fenotip més sever de nanisme i floració primerenca (fig. 32.A i C).

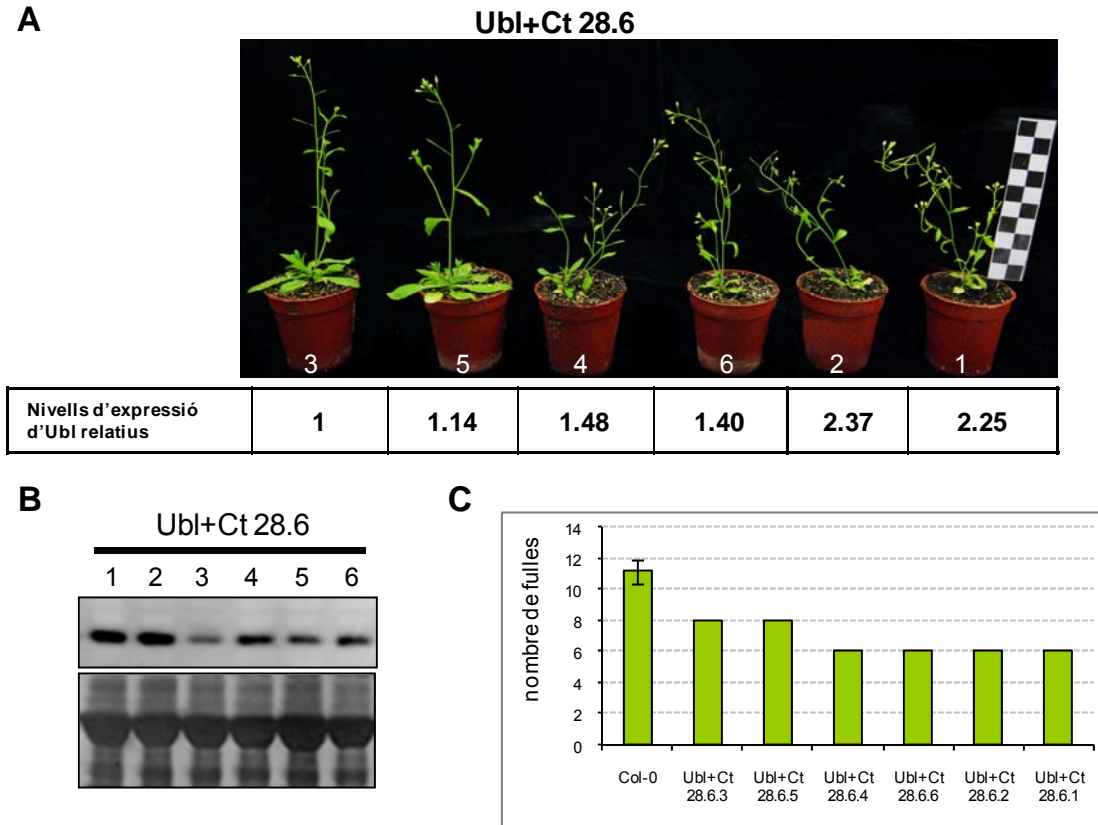


Fig. 32. Anàlisi fenotípic de les noves línies de plantes transgèniques. **A.** Plantes de 3 setmanes d'edat cultivades a terra en règim de dia llarg. Es mostren la descendència d'una línia transgènica. S'observa el lleuger nanisme d'aquestes plantes. **B.** Anàlisi de les mateixes plantes que en A. per a l'expressió del domini AtE1 Ubl. Anàlisi per *western blot* amb anticòs policlonal anti-SAE2. A la part inferior es mostra la tinció amb Coomassie de la subunitat gran de la RuBisCO (55kDa) utilitzat com a control de càrrega. Cada carril conté 18 µg de proteïna total. **C.** Nombre de fulles presents a la roseta al moment de floració en règim de dia llarg. Els individus descendents de la línia transgènica 28.6 floreixen amb 6 i 8 fulles de roseta, en comparació amb plantes Col-0 que floreixen amb 11.17 ± 0.75 fulles de roseta de mitjana.

3.2.2 Anàlisi de la resposta de les plantes transgèniques a situacions d'estrès abiòtic

En situacions d'estrès de diferents tipus les plantes necessiten una maquinària de conjugació de SUMO molt activa ja que s'observa un augment en el nivell de conjugats de SUMO. Per aquesta raó, les plantes expressores del domini AtE1 Ubl es van sotmetre a situacions d'estrès hídric. Es van sotmetre plantes Col-0 i plantes transgèniques a deshidratació i es va analitzar el seu contingut en conjugats de SUMO a diferents temps (fig. 33).

A la figura s'observa com les plantes silvestres *Col-0* acumulen conjugats de SUMO després de l'exposició a l'estrès. En el cas de les plantes expressores del domini AtE1 Ubl també es donava aquesta acumulació de conjugats, però en menor grau. En aquest anàlisi es va observar de nou la correlació entre nivells d'expressió del domini AtE1 Ubl i la resposta a l'estrès. La menor acumulació de conjugats de SUMO era més agreujada en les plantes Ubl+Ct 1.4, que són les que presentaven majors nivells d'expressió del domini AtE1 Ubl que les plantes Ubl+Ct 1.7.

A més, en aquesta figura també es pot observar com les plantes transgèniques no mostraven una disminució significativa en els nivells de conjugats de SUMO basals (temps 0) en comparació amb les plantes *Col-0*.

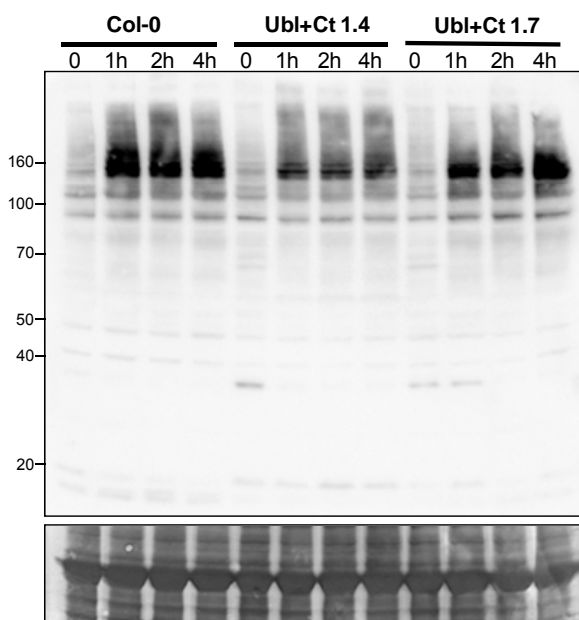


Fig. 33. Nivells de sumoilació en plantes sotmeses a estrès hídric. Extractes de proteïna de fulles de roseta de plantes *Col-0* i plantes transgèniques de 16 dies d'edat cultivades a dia llarg en medi MS. Plantes sotmeses a sequera durant 0, 1, 2 i 4 hores. Els conjugats de SUMO endògens van ser detectats per anàlisi *western blot* amb anticòs policlonal anti-AtSUMO. A la part inferior es mostra la tinció amb Coomassie de la subunitat gran de la RuBisCO (55kDa) utilitzat com a control de càrrega. Cada carril conté 18 µg de proteïna.

4. DISCUSSIÓ

1. El sistema de sumoilació a *A. thaliana*. Isoformes de SUMO

En aquest treball s'ha adreçat la caracterització funcional del sistema de sumoilació d'*Arabidopsis*.

La família de proteïnes SUMO representa una classe de polipèptids que són afegits postraduccionalment i regulen l'activitat, localització, estabilitat i propietats de nombroses proteïnes a eucariotes. A *Arabidopsis*, la maquinària de conjugació de SUMO presenta una gran complexitat en quant a nombre de components. A través de diverses cerques a les bases de dades del genoma d'*A. thaliana*, Kurepa i col·laboradors van identificar 26 locus que codifiquen per a putatius membres de la maquinària de sumoilació (Kurepa *et al.* 2003). Entre aquests gens, els que s'expressen es podrien agrupar en els següents grups funcionals: 4 gens que codifiquen per SUMO, tres per l'enzim activador SAE, un per l'enzim conjugador SCE, un per la E3 lligasa SIZ1, i quatre per a proteases de SUMO (Taula 1). De les isoformes de SUMO que s'expressen, *AtSUMO1/2/3* i *5*, es van detectar nivells de mRNA a tots els teixits de la planta i durant els diferents estadis de desenvolupament (fig. 5), però no existien dades experimentals que avaluessin la seva capacitat per ser conjugades. En aquest treball, mitjançant assajos de sumoilació *in vitro*, s'ha estudiat la capacitat de les diferents isoformes de SUMO de ser conjugades a un substrat acceptor que conté la seqüència consens de sumoilació. S'ha observat que *AtSUMO1*, *2* i *3* són capaços de ser conjugats al substrat, tot i que *AtSUMO3* es conjugat d'una manera més ineficient, amb una taxa fins a quatre vegades inferior que *AtSUMO1* i *2* (fig. 18). En canvi, *AtSUMO5* no es conjugat en nivells que es puguin detectar en cap de les situacions estudiades amb el nostre sistema experimental. Aquests resultats són consistents amb els ja existents a la literatura on es va descriure que les isoformes de *AtSUMO1*, *2* i *3* d'*Arabidopsis* són conjugats a substrats endògens. En aquests estudis, es van generar anticossos dirigits contra *AtSUMO1/2* (Kurepa *et al.* 2003; Lois *et al.* 2003; Murtas *et al.* 2003), i altres dirigits contra *AtSUMO3* (Kurepa *et al.* 2003) que detectaven les formes lliures i les conjugades a substrats *in vivo*. No obstant, els resultats obtinguts per *AtSUMO3* necessitarien ser corroborats ja que tant els nivells de la forma lliure com de la conjugada son molt baixos, i a més els autors no van avaluar l'efecte que el

reconeixement creuat d'AtSUMO1 pels anticossos generats contra AtSUMO3 podria exercir en la detecció d'AtSUMO3 endogen. En el cas de AtSUMO5, sols s'han detectat proteïnes que presumiblement son conjugats d'aquesta isoforma en plantes transgèniques que expressaven la forma madura d'AtSUMO5, amb el domini glicina-glicina exposat a l'extrem C-terminal, i no en plantes silvestres (Budhiraja *et al.* 2009). Considerant que no s'ha pogut trobar cap proteasa endògena responsable de la maduració d'AtSUMO5, és qüestionable la rellevància biològica d'aquests resultats. Per una altra banda, tampoc s'ha pogut demostrar l'existència de cap proteasa responsable de la desconjugació d'AtSUMO5 d'un substrat. Aquests estudis, que adreçaven l'especificitat de substrat de les proteases de SUMO que s'expressen en *Arabidopsis*, AtULP1a, AtULP1c, AtULP1d i AtESD4, van analitzar tant l'activitat peptidasa (maduració de SUMO) com isopeptidasa (desconjugació de substrat) d'aquests enzims. Els resultats obtinguts van demostrar que totes les proteases presentaven activitat peptidasa i isopeptidasa amb AtSUMO1/2 com a substrats, i tan sols AtUPL1A catalitzava la maduració de AtSUMO3 de manera ineficient però no la seva desconjugació (Chosed *et al.* 2006). Sorprenentment i de forma paral·lela, altres autors van demostrar que XopD, proteasa del sistema de secreció del tipus III del patogen *Xanthomonas campestris*, era capaç de catalitzar la desconjugació AtSUMO3 del substrat ScPCNA d'una manera eficient (Colby *et al.* 2006). Les proteases de SUMO utilitzades en aquests estudis van ser identificades en base al seu grau de conservació amb la proteasa de SUMO de llevat ULP1 i, per tant, no es pot descartar l'existència d'altres proteïnes a *Arabidopsis* que presentin activitat ULP però que no presentin homologia de seqüència amb les ULP1s conegudes fins al moment. Recolzant aquesta possibilitat, existeix un estudi en el que es va descriure una activitat proteasa d'ubiquitina continguda en el extrem amino terminal d'una proteïna del tegument del virus herpes simplex 1, i que no presentava homologia de seqüència amb cap proteasa d'ubiquitina coneguda (Kattenhorn *et al.* 2005). Tot i que, per una altra banda, no s'ha descrit que la divergència assolida entre membres d'aquesta família de proteases en un determinat organisme sigui suficientment gran per no ser identificats en estudis d'homologia. En aquest context seria necessari realitzar estudis més exhaustius per tal

de determinar si AtSUMO5 és substrat de proteases endògenes encara no identificades o, si per el contrari, existeix només en forma immadura *in vivo*.

Les isoformes AtSUMO1 i AtSUMO2 presenten un alt grau d'homologia en la seva seqüència aminoacídica (Lois *et al.* 2003) i uns nivells d'expressió semblants en diferents teixits de la planta (fig. 5), suggerint que podrien tenir un paper redundant *in vivo*. L'estudi de mutants nuls per inserció de T-DNA en les seqüències codificants de *AtSUMO1* i *AtSUMO2* van demostrar que aquestes isoformes de SUMO eren funcionalment redundants, però al mateix temps tenien un paper essencial durant el desenvolupament de la llavor ja que els mutants dobles, *atsumo1 atsumo2*, eren letals (Saracco *et al.* 2007). Per un altra banda, l'expressió de les altres isoformes de SUMO d'*Arabidopsis*, *AtSUMO3* i *5*, és de l'ordre de 10 vegades inferior que les isoformes *AtSUMO1/2*, tot i que presenten expressió a tots els teixits (fig. 5). A més, tenint en compte que *AtSUMO3* i *5* no poden complementar el fenotip letal de les plantes mutants *atsumo1 atsumo2*, caldria pensar que la seva funció *in vivo* s'ha especialitzat significativament.

Considerant les dades experimentals obtingudes fins al moment, es podria suggerir que *AtSUMO3* té una funció més específica i no tan bàsica com *AtSUMO1* i *AtSUMO2* a *Arabidopsis*. Com ja s'ha comentat, la única proteasa capaç de desconjugar *AtSUMO3* d'un substrat és la proteasa del patogen bacterià XopD. Aquesta propietat, juntament al fet de que *AtSUMO3* presenta nivells molt baixos tant de la forma lliure com de la conjugada *in vivo*, suggereix que es podria haver especialitzat en respostes a estrès biòtic. En aquest model, *AtSUMO3* podria formar part del sistema de defensa de la planta, o podria ser una diana de l'hoste que el patogen hauria de modificar per tal d'afavorir el procés d'infecció. Respecte a *AtSUMO5*, considerant els baixos nivells d'expressió que presenta, la seva incapacitat de ser conjugat a un substrat *in vitro*, el fet de que no s'ha identificat cap proteïna de plantes o bacteriana amb activitat proteasa de *AtSUMO5* i que la seva conjugació en plantes silvestres no s'ha demostrat, el paper biològic d'aquesta proteïna a *Arabidopsis* com a modificador postraduccional està encara per determinar, i s'esperaria que fos molt específica o bé que tingués una funció mediada per interaccions no covalents.

De forma interessant, existeixen certs paral·lelismes entre les isoformes de SUMO a mamífers i a *Arabidopsis*. En mamífers, SUMO està codificat per una família de gens composta per quatre membres (Bohren *et al.* 2004; Johnson 2004). Les formes humanes SUMO2 i 3 formen cadenes polimèriques i la conjugació d'aquests pèptids a proteïnes diana augmenta en resposta a estressos abiòtics de manera semblant al que passa amb AtSUMO1 i 2 d'*Arabidopsis*. En canvi, HsSUMO1 no és capaç de formar cadenes i la seva conjugació *in vivo* no respon a estímuls d'estrès tal i com s'ha descrit per AtSUMO3 (Saitoh i Hinchev 2000; Tatham *et al.* 2001) (Kurepa *et al.* 2003; Colby *et al.* 2006); tot i que també es donen certes divergències com és el fet de que HsSUMO1 és conjugat per la maquinària de sumoilació humana amb la mateixa eficiència que HsSUMO2/3 (Lois i Lima 2005), i és un substrat eficient per a proteases endògenes (Yeh 2009), a diferència del que té lloc amb AtSUMO3. L'altra isoforma de SUMO a mamífers, HsSUMO4, presenta una seqüència aminoacídica atípica al voltant de l'extrem C-terminal que evita el seu processament, per tant sols existeix en forma de precursor i mai en la seva forma madura, de manera similar al que sembla que pot ocórrer amb AtSUMO5. És per això que s'ha proposat que la funció de HsSUMO4 pot estar mitjançada per interaccions no covalents amb les seves proteïnes diana (Owerbach *et al.* 2005), tot i que també hi ha autors que no el consideren com un autèntic paràleg de SUMO (Geoffroy i Hay 2009). A pesar d'aquests paral·lelismes entre algunes de les propietats de les isoformes de SUMO humanes i d'*Arabidopsis*, no es poden definir relacions d'ortòlegs basades en homologia de seqüència ja que el grau de conservació entre qualsevol de les isoformes de SUMO d'*Arabidopsis* i qualsevol de les isoformes humanes és molt semblant.

En resum, en aquesta tesi es presenta un estudi de les diferents isoformes de SUMO d'*Arabidopsis*, el qual revela que aquestes isoformes presenten característiques cinètiques específiques que podrien reflectir diferències funcionals *in vivo*. Encara que una qüestió pendent per resoldre és determinar l'espectre de substrats que presenten les diferents isoformes de SUMO. Els primers estudis dirigits a respondre a aquesta pregunta han estat recentment publicats per Budhiraja i col·laboradors. Aquests autors han identificat 14 nous substrats putatius de SUMO a partir de plantes que expressen

la forma madura de les isoformes de SUMO 1, 3 o 5 d'*Arabidopsis*. D'aquests, sis s'han identificat a partir de plantes que expressen AtSUMO1, quatre a partir de plantes que expressen AtSUMO3, tres a partir de plantes que expressen AtSUMO1 ó 3, i un a partir de plantes que expressen AtSUMO3 ó 5. En el mateix estudi, només s'ha provat la capacitat de ser conjugat *in vitro* per sis d'aquests substrats, un dels quals ha resultat ser negatiu. A més, en aquests assajos *in vitro*, s'ha utilitzat exclusivament AtSUMO1 com a modificador i no la isoforma que teòricament era responsable de la modificació *in vivo*, de manera que queda per determinar si hi ha una possible especificitat de substrat depenent d'isoforma de SUMO. A pesar de les qüestions que queden encara per resoldre, una conclusió que s'extreu d'aquests resultats és la dificultat d'identificar AtSUMO5 conjugat a substrats in planta, el que reforça les nostres observacions en relació a la seva incapacitat de ser conjugat *in vitro*.

Per últim, encara estan per dilucidar les funcions biològiques de AtSUMO3 i 5. Per adreçar aquesta qüestió seria convenient disposar dels mutants nuls per a l'expressió de *AtSUMO3* i *5*, però fins aleshores no s'ha pogut identificar cap anotació en les bancs de mutants per inserció de T-DNA que correspongui a aquests gens. Una estratègia alternativa consistiria en tractar del reduir els nivells d'expressió d'aquestes isoformes de SUMO per interferència de RNA. En qualsevol dels casos, seria molt interessant determinar en primer lloc el grau de viabilitat d'aquestes plantes amb nivells reduïts d'AtSUMO3 o 5 en condicions normals de creixement. Per una altra banda, també s'hauria d'avaluar el paper d'aquestes proteïnes en respostes a estrès. Concretament, en el cas dels mutants *atsumo3*, tenint en compte la capacitat de la proteasa bacteriana XopD de desconjugar AtSUMO3 d'un substrat, seria especialment rellevant estudiar possibles alteracions en les respostes de defensa d'aquestes plantes davant de patògens bacterians.

2. L'enzim activador de SUMO a *A. thaliana*

L'enzim activador de SUMO a *Arabidopsis* (AtSAE o AtE1) consisteix en un heterodímer format per una subunitat gran (AtSAE2) i una subunitat petita (AtSAE1). Un fet que distingeix *Arabidopsis* del sistema de sumoilació de mamífers i llevat, és la presència de dos subunitats SAE1 (AtSAE1a i AtSAE1b). La similitud entre la seqüències d'aminoàcids d'aquestes proteïnes amb els seus homòlegs humans (fig. 8) indiquen que la via de conjugació de SUMO està fortament conservada durant l'evolució d'eucariotes. Degut a aquest alt grau d'homologia entre les diferents formes, s'ha pogut realitzar una predicció de l'estructura d'aquest enzim a partir de l'estructura de la forma humana (fig. 9). Al comparar les isoformes de AtSAE1, s'observa que les diferències de seqüència aminoacídica no estan localitzades en una regió concreta, sinó que estan disperses per tota l'estructura de la proteïna (fig. 9.B). Aquestes dades revelen que no hi ha cap domini ni regió de la proteïna fortament diferenciat entre AtSAE1a i AtSAE1b que pugui indicar una diferència funcional a priori.

El mecanisme d'activació de SUMO i la transferència del mateix des de E1 a E2 també es va descriure en sistemes mamífers (Lois i Lima 2005). Seguidament a l'activació de SUMO, es produeix una transesterificació i SUMO es transferit des de E1 a la cisteïna catalítica de SCE. En aquest pas de transferència de tioéster, SCE és reconegut per la subunitat gran de l'enzim activador, SAE2, concretament per un domini denominat Ubl. Aquests autors revelaren el paper directe i essencial del domini SAE2 Ubl en la transferència de tioéster des de E1-SUMO a E2. Aquests estudis van determinar que l'enzim mutant E1 Δ Ubl és capaç d'adenilar SUMO però és deficient en la transferència de tioéster a E2 *in vitro*. A més, *in vivo*, la forma mutada de llevat E1 Δ Ubl no podia revertir el fenotip letal de la soca nul·la de llevat Δ uba2 (Lois i Lima 2005).

Aquest domini Ubl de l'enzim activador, que és essencial per a la conjugació de SUMO, està conservat a tots els enzims E1 que transfereixen ubiquitina o proteïnes similars a la ubiquitina a enzims conjugadors E2. Durant aquesta tesi s'ha comprovat

que aquest mecanisme de transferència de tioéster des de el complex E1-SUMO cap a E2 també està conservat a plantes, ja que en assajos de sumoilació *in vitro* en presència de l'enzim AtE1ΔUbl no es produeix la reacció de sumoilació (fig. 26). A més, el domini AtSAE2 Ubl actua com a dominant negatiu en assajos de sumoilació *in vitro*, disminuint l'eficiència de la sumoilació en una manera dependent de la concentració del domini Ubl (fig. 30). Així s'ha demostrat que el procés d'activació i transferència de SUMO des de E1 a E2 a *Arabidopsis* té un mecanisme d'acció molt similar al descrit per a les formes humana i de llevat.

Per altra banda, mitjançant l'anàlisi de bases de dades d'expressió gènica s'ha determinat que *AtSAE2*, *AtSAE1a* i *AtSAE1b* presenten nivells d'expressió detectables a tots els teixits de la planta i amb uns valors relatius de 1, 6.5 i 3.8, respectivament (fig. 5). Alternativament, s'ha analitzat els nivells de mRNA de *AtSAE1a* i *AtSAE1b* mitjançant tècniques de *Northern blot*. D'aquesta manera s'ha determinat que cada isoforma s'expressa de manera similar en els diferents teixits i estadis de desenvolupament de la planta analitzats (fig. 6). En canvi, quan s'han analitzat els nivells d'expressió *in silico* més detalladament, ampliant el número d'estadis analitzats, les observacions inicials canvien i el que s'observa és l'existència de certes diferències que podrien ser significatives en determinats moments del desenvolupament (fig. 7). Específicament, *AtSAE1b* sembla augmentar els seus nivells d'expressió al final del desenvolupament de la llavor, coincidint amb l'etapa de maduració que es caracteritza per la dessecació de la llavor i el desenvolupament de la dormància.

En sistemes mamífers i en llevat s'han identificat substrats de SUMO que localitzen a diferents compartiments subcel·lulars, tot i que la maquinària de sumoilació localitza principalment al nucli i a l'envolta nuclear (Johnson i Blobel 1999; Huh *et al.* 2003). A *Arabidopsis*, estudis previs van determinar que AtSUMO1/2 presenten una distribució generalitzada a la cèl·lula, mentre que l'enzim conjugador AtSCE1 es localitza en una proporció més gran al nucli (Lois *et al.* 2003). En el cas de l'enzim activador AtSAE, s'ha observat que tant la subunitat petita com la subunitat gran, presenten una localització predominantment nuclear (fig. 11). La localització nuclear de AtSAE2 es deguda a la

presència de la seqüència de localització al nucli (NLS) situada al seu extrem carboxi-terminal (fig. 11B), ja que en la forma mutada amb la deleció de l'extrem Cterminal queda abolida la distribució nuclear. Aquesta localització preferentment nuclear de la maquinària de sumoilació correlaciona amb el fet de que la majoria de conjugats de SUMO localitzen al nucli (Saracco *et al.* 2007), i, dels pocs identificats, corresponen a factors de transcripció i proteïnes relacionades amb l'estructura de la cromatina (Budhiraja *et al.* 2009).

Als experiments realitzats de localització de AtE1, es van observar diferències en el comportament de les dues isoformes de la subunitat petita de AtE1. Mentre que la isoforma AtSAE1b localitzava únicament al nucli, colocalitzant amb AtSAE2, la isoforma AtSAE1a presentava una localització majoritàriament nuclear però també es podia detectar al citoplasma en menor grau (fig. 11B). Aquesta capacitat de localitzar en absència de AtSAE2 podria suggerir una major estabilitat de AtSAE1a en comparació amb AtSAE1b. Per abordar aquesta hipòtesi es van utilitzar dues aproximacions diferents, per una banda es va estudiar la dinàmica d'expressió d'ambdues isoformes en el sistema heteròleg de cèl·lules d'*E.coli* (fig. 12), i per altra banda es van analitzar les corbes de desnaturalització dels complexos AtE1a i AtE1b per tècniques de calorimetria diferencial de rastreig (fig. 13). Els resultats obtinguts en ambdós casos recolzaven l'observació realitzada *in vivo* en relació a una major estabilitat de la isoforma AtSAE1a. Tenint en compte aquestes observacions, ens varem plantejar si aquestes diferències afectarien la capacitat d'activació de SUMO. Amb aquesta finalitat, es van realitzar assajos de sumoilació *in vitro* en presència de les dues isoformes de AtE1 i, en les condicions assajades, els nostres resultats indicaven que la isoforma AtE1a confereix una taxa de conjugació de SUMO més elevada que la isoforma AtE1b (fig. 17). Amb aquestes dades, juntament amb el paper de la sumoilació en les respostes a estrès per altes temperatures a *Arabidopsis*, suggereixen que la isoforma AtE1a podria tindre un paper predominant en les respostes a estrès per calor a la planta, o en general, en situacions en les que es requereix una elevada capacitat de sumoilació.

Estudis *in planta* d'aquests enzims van demostrar que la isoforma AtE1a no és essencial per al desenvolupament de la planta. Mutants homozigots per a la inserció de T-DNA que afecta a la seqüència que codifica per a *AtSAE1a* eren perfectament viables i no presentaven cap anomalia fenotípica (Saracco *et al.* 2007), suggerint que en condicions normals de creixement la isoforma AtE1b és capaç de complementar la isoforma AtE1a. En canvi, nosaltres hem observat que després d'exposar plantes mutants *atsae1a.3* a situacions d'estrès per elevades temperatures, presentaven una menor acumulació de conjugats de SUMO que les plantes azigotes per aquesta mutació (fig. 23). Addicionalment, aquestes plantes mutants, van ser sotmeses a situacions d'estrès per deshidratació i es va observar que en aquesta situació, també acumulaven una menor quantitat de conjugats de SUMO (fig. 24). Amb aquests resultats es podria suggerir un paper predominant de la isoforma AtE1a en les respostes de la planta enfront de situacions d'estrès per calor i deshidratació. Encara que aquesta menor acumulació de conjugats a les plantes mutants *atsae1a.3* també podria explicar-se per la suposada reducció de la quantitat total de AtSAE1 (*AtSAE1a* + *AtSAE1b*) a les cèl·lules. Per poder respondre aquesta pregunta seria necessari obtenir mutants nuls per a l'expressió de la isoforma *AtSAE1b* i sotmetre aquestes plantes als mateixos anàlisis que els realitzats amb els mutants *atsae1a.3*. Els resultats obtinguts ens permetrien determinar si la isoforma *AtSAE1a* és la principal responsable de la taxa de conjugació en respostes a estrès, en el cas de que no es detectessin diferències entre plantes silvestres i les plantes mutants *atsae1b*. O pel contrari, si ambdues isoformes contribueixen de manera proporcional, en el cas que el grau de conjugació estigués disminuït també a les plantes *atsae1b*. En qualsevol cas, les nostres dades indiquen que la isoforma *AtSAE1b* no pot complementar la mutació *atsae1a* en totes les situacions de creixement i que, per tant, no són totalment redundants.

A més, la disponibilitat d'aquests mutants *atsae1b*, i tenint en compte les dades que suggereixen que s'indueix la seva expressió en etapes tardanes del desenvolupament de la llavor, ens permetria analitzar el paper de *AtSAE1b* en la viabilitat de les llavors, alteracions de la dormància o l'acumulació de reserves. En el cas de que aquesta mutació fos letal en homozigosi, es podria tractar de revertir aquest fenotip letal transformant plantes mutants heterozigotes amb la seqüència de *AtSAE1b* sota el

control d'un promotor específic de llavor. Si en la descendència d'aquestes plantes es trobessin individus homozigots per a la mutació, quedaria palesa la importància de AtSAE1b en aquest procés biològic tant important per les plantes, i això generaria noves qüestions relacionades amb el mecanisme d'acció *in vivo* d'aquestes isoformes de l'enzim activador.

En resum, aquest treball aporta una caracterització bioquímica i funcional de les diferents isoformes de l'enzim activador de SUMO d'*Arabidopsis* que proporciona les primeres evidències que recolçarien un paper especialitzat de les dues isoformes de l'enzim activador, constituint un nou pas de regulació de la cascada de conjugació.

3. Interacció no covalent AtSUMO-AtSCE

Poc després del descobriment de SUMO com a modificador postraduccional, es va descriure la capacitat de SUMO per interaccionar de manera no covalent amb el seu corresponent E2, tot i que la rellevància d'aquesta interacció no s'ha posat de manifest fins la resolució de les estructures del complex E2-SUMO en interacció no covalent. Els determinats estructurals responsables d'aquesta interacció estan conservats en humans i llevat (Capili i Lima 2007), suggerint que és un mecanisme conservat. Aprofitant l'alt grau de conservació de SUMO i de l'enzim conjugador AtSCE1 d'*Arabidopsis* amb els seus ortòlegs humans, hem pogut desenvolupar el model d'aquest complex amb les proteïnes d'*A. thaliana* (fig. 20).

Mitjançant estudis de doble híbrid de llevat, els primers estudis dirigits a la caracterització de la maquinària de sumoilació a *Arabidopsis* ja van determinar la capacitat de AtSUMO1/2 d'interaccionar de manera específica amb l'enzim conjugador de SUMO, AtSCE1, i no amb l'enzim conjugador d'ubiquitina, AtUBC10, (Lois *et al.* 2003). En aquesta tesi s'ha ampliat aquest a les altres isoformes de SUMO, AtSUMO3 i 5, i s'ha observat que no poden interaccionar amb AtSCE1 (fig. 19). Addicionalment, altres investigadors van demostrar la capacitat de les isoformes AtSUMO1 i AtSUMO2 de formar cadenes de poliSUMO *in vitro*, mentre que AtSUMO3 no presenta aquesta

capacitat, i a més, no presenta el motiu consens de sumoilació en la seva seqüència (Colby *et al.* 2006; Budhiraja *et al.* 2009). Donats aquests resultats, s'observa una clara relació entre les interaccions no covalents entre E2 i SUMO i la capacitat de formar cadenes polimèriques de SUMO ja suggerit en altres estudis (Capili i Lima 2007). Aquests autors, al comparar les estructures E2-SUMO i E2-SUMO-RanGAP1, observaren que a les superfícies d'interacció de l'E2 amb el substrat i amb SUMO no es solapen. D'aquesta manera suggerien que l'enzim conjugador carregat amb un SUMO mitjançant l'enllaç tioéster, pot interaccionar amb un altre SUMO i el substrat simultàniament, i d'aquesta manera s'afavoriria el creixement de les cadenes de poliSUMO en un substrat.

Les interaccions no covalents entre E2 i SUMO són semblants a les observades en altres complexos no covalents en la via de la ubiquitina (Dye i Schulman 2007), com per exemple interaccions entre ubiquitina i l'enzim E2 UbcH5 (Brzovic *et al.* 2006). Aquests autors van proposar que el complex d'interaccions no covalents entre UbcH5 i ubiquitina facilitava la formació de cadenes d'ubiquitina ja que mutacions a UbcH5 que abolien les interaccions no covalents amb l'ubiquitina, també abolien l'habilitat de UbcH5 de catalitzar l'addició de cadenes d'ubiquitina a BRCA1 (Brzovic *et al.* 2006). Altres autors van descriure interaccions similars entre Ubc2b i ubiquitina (Miura *et al.* 1999) i per Ubc4 i Nedd8 (Sakata *et al.* 2007).

Els residus a SUMO i a E2 implicats en mantenir aquesta interacció estan conservats als ortòlegs de SUMO i E2 a llevat, a més totes les isoformes de SUMO humanes mantenen la capacitat d'interaccionar amb el seu corresponent E2 a pesar de que, en el cas de HsSUMO1, no formin cadenes de poliSUMO (Capili i Lima 2007). Al comparar la seqüència aminoacídica de les isoformes de SUMO d'*Arabidopsis*, s'observen diversos canvis en els residus que determinen la interacció no covalent amb l'E2 (fig. 20.D). Entre aquests residus, hi ha dos posicions que presenten una gran variabilitat. Aquestes són les posicions 85 i 87, on no s'observa una conservació en els residus presents a les diferents isoformes de SUMO d'*Arabidopsis*. Per altra banda, la diferència que comporta un canvi més dramàtic correspon al residu 63, on es produeix un canvi d'un àcid aspàrtic a AtSUMO1/2 per una asparagina a AtSUMO3/5. A més, a

les isoformes de SUMO humanes, en aquesta posició sempre està un residu amb caràcter àcid, a HsSUMO1 és un àcid glutàmic i a HsSUMO2/3 és un àcid aspàrtic.

Per comprovar si aquest canvi de residu a AtSUMO3 i 5 és el responsable de que no interaccionin amb l'E2 es podrien realitzar experiments de mutagènesi dirigida. Es podria substituir la asparagina 63 de AtSUMO3 i 5 per un àcid aspàrtic i al contrari amb AtSUMO1 i 2, substituir l'àcid aspàrtic 63 per una asparagina. Posteriorment mitjançant assajos de doble híbrid de llevat es podria analitzar si aquesta mutació proporciona a AtSUMO3 i 5 la capacitat d'interaccionar amb E2 i, al contrari, amb AtSUMO1 i 2. Addicionalment, aquestes formes mutades de AtSUMO podrien ser expressades i purificades i així poder caracteritzar-les enzimàticament mitjançant assajos de sumoilació *in vitro*. D'aquesta manera es podria analitzar si aquest canvi de residu altera l'eficiència en la conjugació d'aquestes isoformes. A més, en el cas que les formes mutades de AtSUMO1 i 2 no interaccionessin amb E2, es podria analitzar la capacitat i eficiència d'aquestes formes mutades de formar cadenes poli-SUMO *in vitro*. D'aquesta manera es podria relacionar d'una manera directa les interaccions no covalents SUMO-E2 i la formació de cadenes poli-SUMO en *Arabidopsis*.

Es possible que la formació de cadenes poliSUMO sigui funcionalment important, de manera similar al paper descrit en llevat i animals (Ulrich 2008). La sumoilació pot crear una superfície d'interacció addicional en la proteïna diana. Aquesta funció requereix un reconeixement específic de SUMO per un domini d'interacció en la proteïna efectora. A llevat, igual que a la majoria d'eucariotes, es va identificar un domini d'interacció amb SUMO (SIM) (Kerscher 2007). Aquests dominis consisteixen en un petit nucli hidrofòbic que normalment està precedit o seguit de residus acídics i/o fosforilats en estructura de fulla- β amb una regió que s'ajusta a la superfície de SUMO. Una altra conseqüència d'aquestes interaccions és que també poden induir canvis conformacionals com és el cas de l'enzim Timina DNA Glicosilasa (TDG), on la modificació per SUMO indueix un canvi cap a una forma amb menor afinitat pel DNA (Kerscher 2007). En principi, les interaccions SIM-SUMO poden ser reforçades per la polimerització de SUMO, simplement per un increment de la concentració local de

SUMO o també possibilitant una relació estequiomètrica 1:1 en la interacció, per la presència de múltiples SIMs en la proteïna efectora.

Al llevat *S. cerevisiae*, les cadenes poli-SUMO no són essencials per la viabilitat, com es va observar als mutants *smt3(3R)* que presentaven substitucions lisina a arginina als llocs susceptibles de sumoilació, en les posicions 11, 15 i 19. Aquests mutants no mostraven defectes durant el creixement vegetatiu ni una disminució significativa en els conjugats de SUMO (Bylebyl *et al.* 2003). L'únic fenotip detectat va ser una reducció significativa en l'eficiència en l'esperulació, suggerint un paper de la polimerització de SUMO a la meiosi (Cheng *et al.* 2006). Es va observar que Smt3 colocalitza amb el complex sinaptonemal (CS), una estructura que col·labora i manté l'aparellament dels cromosomes homòlegs en la divisió meiòtica. Un component del CS, Zip1, es va descriure que interacciona amb Smt3 i varies proteïnes sumoilades, i un segon component, Zip3, conté un domini SP-RING relacionat amb les lligases de SUMO tipus Siz-PIAS. A més, es va observar que Zip3 promovia la formació de cadenes Smt3 *in vitro*. Al mutant *smt3(3R)*, Zip1 no localitzava correctament, i com a resultat, s'obtenia una estructura anormal del CS que probablement era la causa dels defectes en l'esperulació. Aquestes observacions revelaren un paper important de les cadenes de Smt3 en el manteniment de la integritat estructural del CS, possiblement pel reclutament i la correcta localització de proteïnes Zip1.

Altres investigadors, van descriure el paper essencial a cèl·lules mamífers de les interaccions no covalents entre CENP-E, una proteïna associada als microtúbuls durant la mitosi, i les cadenes poli-SUMO2/3 en l'associació de cinetocors. Basant-se en aquestes observacions, aquests autors van proposar que la sumoilació de proteïnes associades al cinetocor i les interaccions no covalents entre CENP-E i aquestes proteïnes sumoilades, regulaven la correcta localització de CENP-E. Per tant, la sumoilació està regulant interaccions proteïna-proteïna requerides per al correcte funcionament del centròmer i el cinetocor (Zhang *et al.* 2008).

Amb tots aquests resultats, seria interessant poder investigar si les cadenes poliSUMO tenen un paper semblant a *Arabidopsis*. Es podrien generar plantes transgèniques expressores de les formes de AtSUMO1 i 2 amb substitucions de les lisines que possibiliten les cadenes poliSUMO per arginines en un fons de plantes

mutants per inserció de T-DNA als loci *AtSUMO1* i 2. D'aquesta manera es podria revertir el fenotip de letalitat d'aquests mutants però s'evitaria la formació de cadenes poliSUMO. De la caracterització d'aquestes plantes es podria observar quin és el paper de les cadenes poliSUMO en plantes i si està involucrat en el correcte desenvolupament dels processos mitòtics i meiòtics. Per exemple es podria avaluar si aquests plantes produeixen gàmetes viables. Respecte la mitosi, s'analitzaria si presenten una mida reduïda de les cèl·lules grans, com per exemple tricomes o cèl·lules epidèrmiques, en comparació amb plantes silvestres. A més, es podria analitzar el contingut de DNA de les cèl·lules vegetals per citometria de flux. D'aquesta manera es podrien observar possibles defectes en la mitosi ja que aquestes cèl·lules contindrien una major quantitat de DNA que cèl·lules de plantes silvestres com a resultat de múltiples replicacions de DNA que no van seguides de les corresponents divisions cel·lulars.

4. La sumoilació és essencial a *Arabidopsis*. Plantes expressores del domini AtE1 Ubl

La sumoilació és un procés essencial a *Arabidopsis*. En aquest treball, s'han analitzat mutants d'inserció de T-DNA que afecten a seqüències que codifiquen per a components de la maquinària de sumoilació i no s'han trobat individus homozigots per aquestes mutacions (fig. 21), indicant que aquestes mutacions són letals en homozigosi. Paral·lelament, altres grups van treballar amb els mateixos mutants arribant a la mateixa conclusió (Saracco *et al.* 2007).

A més, durant aquesta tesi s'han analitzat els individus heterozigots per aquesta mutació i s'ha observat que presentaven una reducció en els nivells de proteïna en comparació amb plantes azigotes per a la mutació. Malgrat aquesta reducció en els nivells de proteïna de la maquinària, aquests mutants no mostraven una reducció significativa en els nivells de conjugats de SUMO (fig. 22), suggerint que la meitat de la dotació gènica és suficient per mantenir els nivells basals de conjugació.

En aquest context, donada la dificultat de treballar amb mutants heterozigots i que aquests no presenten una disminució en els nivells de conjugació de SUMO basals, es va dissenyar una estratègia basada en l'expressió constitutiva d'un dominant negatiu. Aquesta estratègia va consistir en generar plantes transgèniques expressores del domini AtSAE2 Ubl per disminuir la capacitat de conjugació de SUMO de la planta sense sobrepassar el llindar de la letalitat. Aquest efecte de competència entre el domini SAE2 Ubl i l'enzim E1 per interaccionar amb E2, ja havia estat descrit per altres autors (Lois i Lima 2005).

En primer lloc es va procedir a la validació de l'estratègia mitjançant assajos *in vitro*, en els que es va observar que augmentant les concentracions del domini Ubl, disminuïa la conjugació de SUMO (fig. 30). Paral·lelament, mitjançant experiments d'expressió transitòria, es va observar que el domini AtSAE2 Ubl i AtE2 interaccionen *in vivo* (fig. 28). Un cop validada l'estratègia, es van generar aquestes plantes transgèniques que expressaven el domini AtSAE2 Ubl sota el control d'un fort promotor constitutiu, el CaMV 35S. Els primers anàlisis van demostrar que aquestes plantes no presentaven una reducció significativa dels nivells de conjugació de SUMO en comparació amb plantes silvestres *Col-0* en condicions estàndard de creixement. En canvi, al sotmetre aquestes plantes a situacions d'estrès per deshidratació es va observar que acumulaven un menor nivell de conjugats de SUMO (fig. 33), manifestant l'efecte d'interferència del domini Ubl amb els enzims AtE1 i AtE2 endògens demostrat *in vitro*.

A pesar de que les plantes transgèniques no presentaven uns nivells de sumoilació basals alterats, mostraven un fenotip de nanisme i floració primerenca en comparació a plantes *Col-0* (fig. 31 i 32). Aquest fenotip de nanisme i floració primerenca ja va ser descrit en l'anàlisi del mutant de la lligasa de SUMO AtSIZ1. Aquestes plantes no presentaven una reducció en els nivells basals de sumoilació i només es va observar una reducció en el nivell de conjugats de SUMO després de sotmetre la planta a diferents situacions d'estressos abiòtics com deshidratació i elevades o baixes temperatures (Miura *et al.* 2005; Yoo *et al.* 2006; Catala *et al.* 2007; Miura *et al.* 2007).

Una possible explicació de la floració primerenca de les plantes expressores del domini AtSAE2 Ubl podria basar-se en una desregulació de l'estructura de la

cromatina, mecanisme necessari per a que la floració tingui lloc en el moment adequat. S'ha establert que els complexos histona deacetilasa (HDAC) estan involucrats en la modificació de la cromatina i actuen com a reguladors de la floració en *Arabidopsis* (Amasino 2004). Per altra banda, es coneix que HDAC en animals és un substrat de SUMO (David *et al.* 2002). Tenint en compte que l'ortòleg de HDAC a *Arabidopsis* presenta el motiu de sumoilació, es podria especular sobre l'existència d'una connexió entre el mecanisme de regulació de la floració i la modificació de HDAC per SUMO.

El fenotip de nanisme de les plantes transgèniques expressores del domini AtSAE2 Ubl també va ser observat en les plantes mutants *atsiz1*. Es va descriure que SIZ1 regula l'expressió de 1600 gens a *Arabidopsis* (Catala *et al.* 2007). Entre aquests gens, 11 codifiquen per a components importants de la via biosintètica i de senyalització de brassinosteroides, hormones que regulen el creixement de les plantes. De manera similar, els mutants *atsiz1* i mutants d'aquests gens mostraven un fenotip de nanisme degut a un defecte en l'elongació cel·lular [*dwf1*, (Takahashi *et al.* 1995); *det2*, (Li *et al.* 1996); *dwf4*, (Azpiroz *et al.* 1998); *hmg1*, (Suzuki *et al.* 2004)] i la proliferació cel·lular [*det2* i *dwf1*, (Nakaya *et al.* 2002)].

A més, *atsiz1* mostrava una reducció en l'expressió del gens implicats en la senyalització per auxina (Catala *et al.* 2007), altra hormona que regula el desenvolupament de la planta (Tanaka *et al.* 2006). Hi ha evidències que indiquen l'existència d'una interacció entre la senyalització per brassinosteroides i auxina, de manera que el mecanisme d'acció dels brassinosteroides podria estar mediat per auxina.

Amb tots aquests resultats, es podria suggerir que a les plantes AtSAE2 Ubl presenten una alteració en la sumoilació de substrats que podrien afectar a la biosíntesi i senyalització de brassinosteroides i a través d'aquests processos, el creixement de la planta. Una hipòtesi raonable és que un regulador de la via brassinosteroide es activat o inactivat per la modificació per SUMO.

Amb tots aquests anàlisis amb plantes que presenten la conjugació de SUMO alterada es dedueix que la sumoilació és una modificació essencial i està regulant processos tan importants com la floració, el creixement i desenvolupament de les

plantes. Això no és sorprenent ja que en altres organismes eucariotes es coneix un gran nombre de proteïnes que són sumoilades i que regulen diversos aspectes importants del desenvolupament (Girdwood *et al.* 2004; Johnson 2004; Watts 2007; Makhnevych *et al.* 2009). La identificació d'aquests substrats de SUMO, ens dóna una idea de la naturalesa pleiotròpica de les funcions de la modificació per SUMO en un ampli ventall de processos cel·lulars.

La llista de substrats de SUMO identificats a plantes encara és reduïda i les investigacions sobre la manera en què SUMO afecta aquests processos biològics està als seus inicis. Hi ha varies característiques del sistema de sumoilació que dificulten el seu anàlisi funcional, com per exemple els reduïts nivells de proteïna modificades per SUMO, la presència d'una elevada activitat proteasa de SUMO als lisats cel·lulars i un número complex d'interaccions entre els diferents enzims i substrats. De fet, per a moltes proteïnes que s'ha descrit que són sumoilades, encara no s'ha determinat si aquesta modificació té una conseqüència funcional i, en molts casos no s'ha demostrat que aquestes proteïnes siguin substrat de SUMO en condicions fisiològiques. Probablement, quan es vagin superant aquestes dificultats, és ben segur que es trobaran més processos en els quals SUMO desenvolupa un paper important i com està regulant aquests processos.

5. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Dels resultats que s'exposen en aquest treball es poden extreure les següents conclusions:

1. La caracterització bioquímica dels components del sistema de sumoilació d'*Arabidopsis* ha posat de manifest que:

a. Les quatre isoformes de SUMO per les que s'ha detectat expressió *in vivo*, AtSUMO1, 2, 3 i 5, presenten una taxa de conjugació diferencial. Així, AtSUMO1/2 són les isoformes que es conjuguen amb una major eficiència, mentre que AtSUMO3 ho fa amb una taxa quatre vegades inferior i, per AtSUMO5, no hem pogut detectar cap nivell de conjugació.

b. A més, les diferents isoformes de SUMO també es diferencien en la seva capacitat per interaccionar de manera no covalent amb l'enzim conjugador de SUMO AtSCE1. Les isoformes amb una major taxa de conjugació, AtSUMO1/2, són competents per interaccionar amb AtSCE1 en assajos de doble híbrid, però aquesta capacitat no està conservada ni en AtSUMO3 ni AtSUMO5.

c. L'activació de SUMO, primera reacció en la cascada de conjugació, podria tenir un paper regulador ja que la caracterització de l'enzim heterodimèric, AtSAE2/AtSAE1, que catalitza aquesta reacció, ha posat de manifest que:

- presenta un senyal de localització nuclear, el que probablement determina que el nucli sigui el compartiment subcel·lular amb major taxa de sumoilació;

- les isoformes de la subunitat petita, AtSAE1a i AtSAE1b, determinen diferents taxes de conjugació de SUMO *in vitro*, sent AtSAE1a la que confereix un nivell de conjugació més alt; així, la capacitat de conjugació *in vivo* podria estar regulada pels nivells relatius de les isoformes AtSAE1a/b presents en un determinat moment i/o teixit;

- la isoforma AtSAE1a és més estable que AtSAE1b *in vivo* e *in vitro*, ja que AtSAE1a pot existir en forma lliure, no acomplexat amb AtSAE2, suggerint que, en situacions de nivells limitants de AtSAE2, el complex AtSAE2/AtSAE1a podria estar afavorit respecte el complex AtSAE2/AtSAE1b;

- mutants nuls per a la subunitat AtSAE1a son viables però presenten una capacitat de sumoilació reduïda en condicions d'estrès, recolzant la hipòtesi d'un paper regulador de l'activació de SUMO *in vivo*.

2. La sumoilació és un procés essencial a plantes tal i com demostra l'anàlisi de plantes homozigotes per a mutacions nul·les als gens que codifiquen tan per a la subunitat gran de l'enzim activador, AtSAE2, com per l'enzim conjugador, AtSCE1.

3. Durant la cascada de conjugació de SUMO, el domini AtE1 Ubl present a AtSAE2 és essencial per a la transferència de SUMO des de l'enzim activador a l'enzim conjugador, el que té lloc mitjançant un mecanisme que implica la interacció directa entre aquest domini i l'enzim conjugador.

4. *In vivo*, l'expressió del domini AtE1 Ubl té un efecte de dominant negatiu de la conjugació de SUMO, la qual cosa es reflecteix en una disminució de la taxa de conjugació en condicions d'estrès i en defectes en el desenvolupament de la planta relacionats amb un fenotip de nanisme i una floració primerenca.

6. MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

A continuació es descriuen tant els materials com els protocols més utilitzats durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral. Els mètodes generals de manipulació d'àcids nucleics i proteïnes, així com els relacionats amb el cultiu i manipulació de bacteris es van realitzar segons els protocols descrits a *Molecular cloning: A laboratory Manual* (Sambrook, 2001) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, 1989).

Els mètodes que es descriuen s'han optimitzat durant aquest treball o es consideren d'especial interès en la realització d'aquesta tesi.

L'aigua utilitzada va ser aigua destil·lada o, en el cas de les solucions utilitzades en els experiments de bioquímica i biologia molecular, aigua bidestil·lada (amb el destil·lador i desionitzadors d'aigua Millipore Mili-Q).

Les solucions utilitzades es van esterilitzar per calor humit [mitjançant autoclau de vapor d'aigua a 120°C i una atmosfera de pressió, durant 20 minuts, s'indica com (autoclau)] o mitjançant filtració [s'indica com (filtració)]. El pH dels medis i solucions s'ajusta abans de sotmetre'ls als cicles d'autoclau.

1.- Material biològic

1.1. Material bacterià

1.1.1. Soques bacterianes

En aquest treball s'han utilitzat les següents soques bacterianes:

- DH5 α : Soca d'*Escherichia coli* utilitzada per al clonatge de vectors.
- BL21 RIL: Soca d'*Escherichia coli* utilitzada per a l'expressió de proteïnes.
- C1C58: Soca d'*Agrobacterium tumefaciens* utilitzada per al clonatge de vectors binaris utilitzats per a la transformació de plantes.

1.1.2. Obtenció de cèl·lules competents per xoc tèrmic

El protocol que es descriu a continuació es va utilitzar per obtenir les cèl·lules competents per xoc tèrmic d'*Escherichia coli*. Primerament es van estriar les cèl·lules en un cultiu en placa per tal que les cèl·lules de partida siguin fresques i vigoroses. Posteriorment es van fer créixer en cultiu líquid.

Procediment:

1. Inocular una colònia aïllada de la soca utilitzada en 50 mL de medi LB.
2. Incubar en agitació (220 rpm) a 37°C durant tota la nit.
3. Inocular 4 mL del cultiu anterior en 400 mL de medi LB.
4. Incubar en agitació (220 rpm) fins que la D.O.₆₀₀=0.375.
5. Refredar el cultiu en gel durant 10 minuts.
6. Centrifugar el cultiu 7 minuts a 1600xg a 4°C sense fre a la centrífuga.
7. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 80 mL de solució CaCl₂ freda.
8. Centrifugar 5 minuts a 1100xg a 4°C.
9. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 80 mL de solució CaCl₂ freda. Mantenir en gel durant 30 minuts.
10. Centrifugar 5 minuts a 1100xg a 4°C.
11. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 16 mL de solució CaCl₂ freda.
12. Aliquotar les cèl·lules en fraccions de 100 µL en tubs eppendorf estèrils i congelar-les amb nitrogen líquid. Guardar-les a -80°C (es poden guardar durant 1 any).

Solucions:

- **Solució CaCl₂** (autoclau): CaCl₂ 60 mM, 15% glicerol (v/v), 10mM PIPES [piperazine-N,N'-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid)] pH 7 (equilibrar amb HCl 1N).

1.1.3. Obtenció de cèl·lules electrocompetents

El protocol que es descriu a continuació es va utilitzar per obtenir les cèl·lules electrocompetents d'*Agrobacterium tumefaciens*. Igual que en l'anterior cas, les cèl·lules es van fer créixer en placa per tal que les cèl·lules de partida fossin fresques i vigoroses. Posteriorment es van fer créixer en cultiu líquid.

Procediment:

1. Créixer O/N un cultiu de la soca C1C58 d'*A. tumefaciens* en medi 2xTY amb rifampicina i carbenicil·lina, en agitació (150 rpm) a 28°C.
2. Inocular un cultiu de 200 mL amb 2 mL (1/100 volums) del cultiu crescut O/N i incubar a 28°C en agitació fins que la D.O.₆₀₀= 0.5-0.8 (aproximadament unes 2.5-3h).
3. Refredar el cultiu en gel de 15 a 30 minuts.
4. Centrifugar 20 minuts a 4000xg a 4°C i descartar el sobrenedant.
5. Resuspendre les cèl·lules en 1 volum del cultiu inicial d'aigua estèril refredada en gel.
Anar en compte de no lisar les cèl·lules.
6. Centrifugar 20 minuts a 4000xg a 4°C i descartar el sobrenedant.
- 7 Repetir els passos 5 i 6, resuspenent les cèl·lules en ½ volum del cultiu inicial d'aigua estèril refredada en gel.
8. Resuspendre les cèl·lules en 1/50 volum del cultiu inicial en glicerol 10% refredat en gel.
9. Centrifugar 20 minuts a 4000xg a 4°C i descartar el sobrenedant.
10. Resuspendre les cèl·lules en 1/100 volums del cultiu inicial de glicerol 10% refredat en gel. La concentració de cèl·lules ha de ser $1-3 \times 10^{10}$ cèl·lules/mL.
11. Fer alíquotes de 50 µL, congelar amb nitrogen líquid i guardar a -80°C.

1.1.4. Medis de cultiu bacterians

Els medis de cultiu bacterià es van preparar amb aigua. Els suplementes o antibiòtics requerits en cada ocasió es van afegir després d'atemperar el medi a 50°C. Aquests mateixos medis van ser utilitzats per al cultiu sòlid a placa de Petri, afegint agar al 1.5%.

- **Medi LB** pH 7.5 (autoclau): Bactotriptonna 10 g/L, extracte de llevat 5 g/L i NaCl 5 g/L. Ajustar el pH amb NaOH. Per al medi sòlid s'afegeix 15 g/L.
- **Medi 2xTY** pH 7.5 (autoclau): Bactotriptonna 16 g/L, extracte de llevat 10 g/L i NaCl 5 g/L. Ajustar el pH amb NaOH.

1.1.5. Suplements dels medis de cultiu bacterians

Majoritàriament els suplements afegits són antibiòtics. A la taula M.I es mostren els diferents suplements utilitzats, les concentracions de les solucions estoc i el dissolvent en el que es preparen, i les concentracions de treball.

Antibiòtic	Estoc	Dissolvent	Concentració de treball		
			<i>E.coli</i>	<i>A.tumefaciens</i>	<i>A.thaliana</i>
Ampicil·lina (Amp)	100 mg/mL	H ₂ O	100 µg/mL	-	-
Carbenicil·lina (Cb)					
Kanamicina (Km)	50 mg/mL	H ₂ O	50 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL
IPTG	1 M	H ₂ O	0.1 mM	-	-
X-GAL	20 mg/mL	DMSO	40 µg/mL	-	-
Rifampicina (Rf)	50 mg/mL	DMSO	-	100 µg/mL	-
Higromicina (Hyg)	50 mg/mL	H ₂ O	-	-	30 µg/mL
Cefotaxima (Cf)	100 mg/mL	H ₂ O	-	-	100 µg/mL
BASTA	20 mg/mL	H ₂ O	-	-	20 µg/mL
PPT					
Espectinomicina	40 mg/mL	H ₂ O	40 µg/mL	40 µg/mL	-

Taula MI. Suplements utilitzats en el treball amb els bacteris *E.coli* i *A.tumefaciens* i amb plantes d'*A.thaliana*.

1.1.6. Condicions de cultiu de bacteris

El cultiu líquid de cèl·lules d'*E.coli* es realitza a 37°C en agitació a 220 rpm. El cultiu sòlid es realitza en placa a 37°C.

El cultiu líquid de cèl·lules d'*A.tumefaciens* es realitza a 28°C en agitació a 150 rpm. El cultiu sòlid es realitza en placa a 28°C.

Els cultius o soques bacterianes s'emmagatzemen permanentment en glicerol 15% a -80°C.

1.2. Material vegetal

1.2.1. Ecotip silvestre

En aquest treball s'ha utilitzat plantes d'*A. thaliana* de l'ecotip Columbia-0 (Col-0).

1.2.2. Línies transgèniques

Plantes Ubl+Ct: Línies que sobreexpressen el domini Ubl+Ct de la subunitat gran de l'enzim activador (AtSAE2) sota el control del promotor constitutiu 35S.

1.2.3. Línies mutants d'inserció de T-DNA

- *atsae1a.3*: Mutant d'inserció de T-DNA en la seqüència que codifica per a AtSAE1a (Salk_060834).

- *atsae2.2*: Mutant d'inserció de T-DNA en la seqüència que codifica per a AtSAE2 (Salk_053023).

- *atsce1.4*: Mutant d'inserció de T-DNA en la seqüència que codifica per a AtSCE1 (Salk_138741).

1.2.4. Condicions de cultiu a l'hivernacle

Les plantes han estat cultivades en testos amb una barreja a parts iguals de torba, perlita i vermiculita.

Les plantes han estat cultivades en hivernacle o en cambres de cultiu controlades.

Hivernacles: Les plantes van ser cultivades en dies llargs o dies curts. En hivern, s'ha suplementat amb llum artificial per tal d'assegurar una durada del dia de 15h. Les condicions de cultiu han estat de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, una humitat ambiental del 49%. Les plantes han estat regades per inundació de les safates que contenen els testos, 3 cops per setmana.

Cambres de cultiu controlades: Les condicions de cultiu a les cambres han estat de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, una humitat ambiental del 60%, i 14h de llum i 10h de fosc a les cambres LD (de l'anglès Long Day), de 10h de llum i 14h de fosc a les cambres SD (de l'anglès Short Day). Les condicions de reg han estat les mateixes que les descrites anteriorment en el cas d'hivernacles.

1.2.5. Medis de cultiu de plantes

- Medi **Murashige i Skoog (MS)** ha segut l'utilitzat per créixer les plantes en plaques de Petri i en condicions estèrils.

Composició MS pH 5.7 (0.5x): Murashige & Skoog (Duchefa) medium including vitamins 2.2 g/L, MES 0.5g/L. Ajustar el pH amb KOH. S'afegeix 8 g/L agar.

- Medi **Gamborg B5** ha segut l'utilitzat per créixer les plantes en cultiu líquid.

Composició B5: Gamborg B5 medium including vitamins B5 (Duchefa) 3.164 g/L, glucosa 20 g/L, MES 0.5g/L. Ajustar el pH amb KOH a 5.7.

1.2.6. Suplements dels medis de cultiu de plantes

Els suplement afegits als medis han estat antibiòtics i herbicides. A la taula M.I es mostren els diferents suplement utilitzats, les concentracions de les solucions d'estoc i el dissolvent en el que es preparen, i les concentracions de treball.

1.2.7. Condicions de cultiu

En condicions *in vitro*, les plantes van ser cultivades en cicles de dia llarg, 14h de llum i 10h de fosc a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, i humitat no controlada. En el cas de cultiu líquid els cultius van ser sotmesos a una agitació constant de 120 rpm.

1.3. Llevat

1.3.1. Soques de llevat

En aquest treball s'ha utilitzat la soca HF7c del llevat *Saccharomyces cerevisiae*.

1.3.2. Obtenció i transformació de cèl·lules competents per xoc tèrmic

El protocol que es descriu a continuació es va utilitzar per obtenir les cèl·lules competents per xoc tèrmic de *S.cerevisiae* amb el mètode LiAc (Ito *et al.* 1983). Primerament es van estriar les cèl·lules en un cultiu en placa per tal que les cèl·lules de partida siguin fresques i vigoroses. Posteriorment es van fer créixer en cultiu líquid.

Procediment:

1. Inocular una colònia aïllada en 1 mL de medi YPD.
2. Agitar vigorosament amb vòrtex durant 5 minuts per dispersar els agregats de cèl·lules.
3. Traspasar aquest mL a un erlenmeier que conté 50 mL de medi YPD.
4. Incubar a 30°C durant 16-18 hores a 220 rpm.
5. Traspasar els 30 mL d'aquest cultiu a un erlenmeier amb 300 mL de medi YPD. La DO₆₀₀ d'aquest cultiu ha de ser major a 0.2-0.3.
6. Incubar 3 hores a 30°C a 220 rpm. En aquest punt la DO₆₀₀ ha de ser 0.4-0.6.
7. Centrifugar el cultiu 5 minuts a 1000xg a TA.
8. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 25 mL d'H₂O.
9. Centrifugar 5 minuts a 1000xg a TA.
10. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 1.5 mL de solució 1XTE/1X LiAc.
11. En un tub eppendorf estèril, afegir 0.1 µg de DNA plasmídic i 0.1 mg de portador de DNA. Posteriorment afegir 0.1 mL de la suspensió de cèl·lules obtingudes al pas 10.
12. Afegir 0.6 mL de solució estèril PEG/LiAc i barrejar amb vòrtex durant 10 seg.
13. Incubar 30 minuts a 30°C a 220 rpm.
14. Afegir 70 µl de DMSO i barrejar invertint el tub. No utilitzar el vòrtex.

15. Fer un xoc tèrmic de 15 minuts a 42°C.
16. Transferir el tub a gel durant 2 minuts.
17. Centrifugar les cèl·lules 5 segons a 14000 rpm a TA. Descartar el sobrenedant.
18. Resuspendre les cèl·lules en 0.5 mL en tampó estèril TE 1X.
19. Plaquejar diferents volums de la transformació en dues plaques de medi SD amb els corresponents marcadors de selecció.
20. Incubar les plaques a 30°C durant 2-3 dies.

Solucions:

- Tampó TE10X (autoclau): Tris-HCl 0.1M, EDTA 10 mM, pH7.5.
- LiAc10X (autoclau): Acetat de liti 1 M, pH 7.5.
- Solució PEG/LiAc: PEG 40% (p/v), tampó TE 1X, LiAc 1X.
- Portador DNA: DNA d'esperma de salmó sonicat 10 mg/mL. Abans del seu ús s'ha de desnaturalitzar a 95°C durant 20 minuts i ràpidament deixar en gel.

1.3.3. Medis de cultiu de llevat

Els medis de cultiu de llevat es van preparar amb aigua. Els suplementes afegits consten de la solució *dropout* amb la manca de l'aminoàcid corresponent en cada ocasió. Aquesta solució es va afegir després d'atemperar el medi a 50°C. Aquests mateixos medis van ser utilitzats per al cultiu sòlid a placa de Petri, afegint agar al 2%.

- **Medi YPD** (autoclau): Difco peptona 20 g/L, extracte de llevat 10 g/L, afegir glucosa 2% estèril després d'autoclavar.
- **Medi SD** (autoclau): Font de nitrogen de llevat sense aminoàcids 6.7 g/L, agar 20 g/L, corresponent solució *dropout* 1X, afegir glucosa 2% estèril després d'autoclavar.
- **Solució *dropout* 10X** (autoclau): L-Adenina 200 mg/L, L-Arginina HCl 200 mg/L, L-Histidina HCl 200 mg/L, L-Isoleucina 300 mg/L, L-Leucina 1000 mg/L, L-Lisina HCl 300 mg/L, L-Metionina 200 mg/L, L-Fenilalanina 500 mg/L, L-treonina 2000 mg/L, L-triptòfan 200 mg/L, L-Tirosina 300 mg/L, L-Uracil 200 mg/L, L-Valina 1500 mg/L.

1.3.4. Condicions de cultiu de bacteris

El cultiu líquid de cèl·lules de *S.cerevisiae* es realitza a 30°C en agitació a 220rpm. El cultiu sòlid es realitza en placa a 30°C.

Els cultius o soques de llevat transformades s'emmagatzemen permanentment en glicerol 15% a -80°C.

1.4. Plasmidis

1.4.1. Vectors

1.4.1.1. Vectors de clonatge de productes de PCR

- pBSK+ (Stratagene): Vector utilitzat pel clonatge intermedi de fragments amplificats per reacció de PCR. Amp^R.

1.4.1.2. Vectors d'expressió en *E.coli*

- pGEX-6P1 (GE Healthcare): Vector utilitzat per l'expressió de proteïnes heteròlogues fusionades a la proteïna GST a cèl·lules *E.coli*. L'expressió està sota el control del promotor tac. Ampicilina^R.

- pET28a (Novagen): Vector utilitzat per l'expressió de proteïnes heteròlogues a cèl·lules *E.coli* sota el control del promotor del fag T7. Kanamicina^R.

- pET15b (Novagen): Vector utilitzat per l'expressió de proteïnes heteròlogues a cèl·lules *E.coli* sota el control del promotor del fag T7. Ampicilina^R.

- pWEN15 (Kost *et al.* 1998): Vector utilitzat per l'expressió transitòria de proteïnes fusionades a la proteïna fluorescent blava a l'extrem C-terminal en cèl·lules vegetals. Ampicilina^R.

- pWEN25 (Kost *et al.* 1998): Vector utilitzat per l'expressió transitòria de proteïnes fusionades a la proteïna fluorescent groga a l'extrem C-terminal en cèl·lules vegetals. Ampicilina^R.

1.4.1.3. Vectors de transformació plantes

- pBA002 (Kost *et al.* 1998): Vector utilitzat per la transformació d'*Agrobacterium* que permet clonar el gen d'interès sota el control del promotor constitutiu 35S. Spectomicina^R en bacteris i BASTA^R en plantes.

1.4.1.4. Vectors assaig doble híbrid de llevat

- pGBKT7 (Clontech): Vector per l'expressió de proteïnes fusionades als aminoàcids 1 al 147 de la proteïna GAL4 (domini d'unió al DNA) a llevat. L'expressió està sota el control del promotor ADH1. Kanamicina^R a bacteris i auxotròfia per a triptòfan a llevat.

- pGADT7 (Clontech): Vector per l'expressió de proteïnes fusionades als aminoàcids 768 al 881 de la proteïna GAL4 (domini d'activació) a llevat. L'expressió està sota el control del promotor ADH1. Ampicilina^R a bacteris i auxotròfia per a leucina a llevat.

1.4.2. Construccions

CONSTRUCCIÓ	DESCRIPCIÓ
Construccions de clonatge de productes de PCR	
pBSK-S3(GG)	cDNA de AtSUMO3 amplificat per RT-PCR amb els encebadors JS7 i JS11 clonat en el vector pBSK+
pBSK-S5(GG)	cDNA de AtSUMO5 amplificat per RT-PCR amb els encebadors JS8 i JS12 clonat en el vector pBSK+
pBSK-SAE2ΔUbl	cDNA de AtSAE2 amb el domini Ubl i l'extrem C-terminal deletionat amplificat a partir de la construcció pET28a-AtSAE2 amb els encebadors ML250 i ML264 i clonat en el vector pBSK+.
pBSK-Ubl+Ct	cDNA del domini Ubl i l'extrem C-terminal de AtSAE2 amplificat amb els encebadors ML265 i JS40 clonat en el vector pBSK+

Construccions per a l'expressió de proteïnes en <i>E.coli</i>	
pET28a-S1(GG)	cDNA de AtSUMO1 amplificat per RT-PCR i clonat en el vector d'expressió d' <i>E.coli</i> pET28a. Obtingut de L. M. Lois.
pET28a-S2(GG)	cDNA de AtSUMO2 amplificat per RT-PCR i clonat en el vector d'expressió d' <i>E.coli</i> pET28a. Obtingut de L. M. Lois.
pET28a-S3(GG)	cDNA de AtSUMO3 aïllat del vector pBSK per digestió amb EcoRI i Sall i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector pET28a.
pET28a-S5(GG)	cDNA de AtSUMO5 aïllat del vector pBSK per digestió amb EcoRI i Sall i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector pET28a.
pET28a-SCE	cDNA de AtSCE amplificat per RT-PCR i clonat en el vector d'expressió d' <i>E.coli</i> pET28a. Obtingut de L. M. Lois.
pET15-SAE1a	cDNA de AtSAE1a amplificat per RT-PCR i clonat en el vector d'expressió d' <i>E.coli</i> pET15. Obtingut de L. M. Lois.
pET15-SAE1b	cDNA de AtSAE1b amplificat per RT-PCR i clonat en el vector d'expressió d' <i>E.coli</i> pET15. Obtingut de L. M. Lois.
pET28a-SAE2	cDNA de AtSAE2 amplificat per RT-PCR i clonat en el vector d'expressió d' <i>E.coli</i> pET28a. Obtingut de L. M. Lois.
pET28a-SAE2ΔUbl	cDNA de AtSAE2 amb el domini Ubl i l'extrem C-terminal deletionat aïllat del vector pBSK per digestió amb SacI i KpnI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector pET28a.
pGEX-6P1-CAT	cDNA de l'extrem C-terminal de la proteïna catalasa que conté la seqüència consens de sumoilació (CAT) clonat dins d'aquestes dianes en el vector pGEX-6P1 aconseguint la fusió de la proteïna GST a l'extrem C-terminal de la Catalasa 3. Obtingut de L. M. Lois
pGEX-6P1-CAT K419A	cDNA de CAT amb la lisina acceptora de SUMO substituïda per una alanina (CAT K419A) per estratègia de mutagènesi dirigida per PCR amb els encebadors JS45 i JS46 i clonat en el vector pGEX-6P1 aconseguint la fusió de la proteïna GST a la proteïna CAT K419A.
pET28a-Ubl+Ct	cDNA del domini AtE1 Ubl i l'extrem C-terminal de AtSAE2 aïllat del vector pBSK per digestió amb BamHI i NotI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector pET28a.
Construccions per als estudis de localització subcel·lular	
pWEN15-SAE1a	cDNA de AtSAE1a amplificat per RT-PCR i clonat en el vector pWEN15 aconseguint la fusió de la proteïna CFP a l'extrem C-terminal de AtSAE1a. Obtingut de L. M. Lois.

Materials i mètodes

pWEN15-SAE1b	cDNA de AtSAE1b amplificat per RT-PCR i clonat en el vector pWEN15 aconseguint la fusió de la proteïna CFP a l'extrem C-terminal de AtSAE1b. Obtingut de L. M. Lois.
pWEN25-SAE2	cDNA de AtSAE2 amplificat per RT-PCR i clonat en el vector pWEN25 aconseguint la fusió de la proteïna YFP a l'extrem C-terminal de AtSAE2. Obtingut de L. M. Lois.
pWEN25-SAE2ΔUbl	cDNA de AtSAE2 amb el domini Ubl i l'extrem C-terminal deletat aïllat del vector pBSK per digestió amb SacI i KpnI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector pWEN25 aconseguint la fusió de la proteïna YFP a l'extrem C-terminal de AtSAE2ΔUbl.
pWEN15-SCE	cDNA de AtSCE amplificat per RT-PCR i clonat en el vector pWEN15 aconseguint la fusió de la proteïna CFP a l'extrem C-terminal de AtSCE. Obtingut de L. M. Lois.
pWEN25-Ubl+Ct	cDNA del domini AtE1 Ubl i l'extrem C-terminal de AtSAE2 aïllat del vector pBSK per digestió amb Sall i KpnI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector pWEN25 aconseguint la fusió de la proteïna YFP al domini Ubl més l'extrem C-terminal de AtSAE2.
Construccions per obtenir sondes	
pBSK-SAE1a	Fragment de 263 pb de la regió 3'UTR de AtSAE1a amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors JS32 i JS33 i clonat en el vector pBSK+.
pBSK-SAE1b	Fragment de 222 pb de la regió 3'UTR de AtSAE1b amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors JS34 i JS35 i clonat en el vector pBSK+.
Construccions per la transformació de plantes	
pBA-Ubl+Ct	cDNA del domini AtE1 Ubl i l'extrem C-terminal de AtSAE2 aïllat del vector pBSK per digestió amb Sall i SpeI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector binari pBA002.
Construccions per l'assaig de doble híbrid de llevat	
pGADT7-S1	cDNA de AtSUMO1 subclonat en el vector pGADT7 aconseguint la fusió de la proteïna AtS1 al domini d'activació de la proteïna GAL4. Obtingut de L. M. Lois.
pGADT7-S3	cDNA de AtSUMO3 aïllat del vector pBSK per digestió amb EcoRI i BamHI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector pGADT7 aconseguint la fusió de la proteïna AtS3 al domini d'activació de la proteïna GAL4.

pGADT7-S5	cDNA de AtSUMO5 aïllat del vector pBSK per digestió amb EcoRI i BamHI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector pGADT7 aconseguint la fusió de la proteïna AtS5 al domini d'activació de la proteïna GAL4.
pGADT7-Ubi	cDNA de ubiquitina amplificat per RT-PCR i clonat en el vector pGADT7 aconseguint la fusió de la proteïna ubiquitina al domini d'activació de la proteïna GAL4. Obtingut de L. M. Lois.
pGBKT7-SCE	cDNA de AtSCE amplificat per RT-PCR i clonat en el vector pGBKT7 aconseguint la fusió de la proteïna AtSCE al domini d'unió al DNA de la proteïna GAL4. Obtingut de L. M. Lois.
pGBKT7-UBC10	cDNA de l'enzim conjugador de la ubiquitina (UBC10) amplificat per RT-PCR i clonat en el vector pGBKT7 aconseguint la fusió de la proteïna AtUBC10 al domini d'unió al DNA de la proteïna GAL4. Obtingut de L. M. Lois.

Taula MII. Construccions emprades en aquest treball.

1.5. Encebadors

NOM	SEQÜÈNCIA	LONG _(pb)	DIRECCIÓ
XFP-Ntb	5' -CAG-GGC-ACG-GGC-AGC-TTG - 3'	18	directe
XFP-Ctb	5' -TCC-GCC-CTG-AGC-AAA-GAC-C - 3'	19	directe
MZ104	5' -GGG-ATG-ACG-CAC-AAT-CCC-ACT-A - 3'	22	directe
MZ107	5' -CGC-AAG-ACC-GGC-AAC-AGG-ATT-C - 3'	22	complementari
3'GAL-DB	5' -CGT-TTT-AAA-ACC-TAA-GAG-TCA-C - 3'	22	complementari
3'GAL-AD	5' -CTT-GCG-GGG-TTT-TTC-AGT-ATC-TAC - 3'	24	complementari
LML 201	5' -CAG-ATA-GAT-TGG-CTT-CAG-TGG-AGA - 3'	24	directe
LML 202	5' -AAT-ACC-ACT-ACA-ATG-GAT-G - 3'	19	directe
LML 213	5' -TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG - 3'	20	directe
LML 214	5' -GCT-AGT-TAT-TGC-TCA-GCG-G - 3'	19	complementari

LML 215	5' -GGG-CTG-GCA-AGC-CAC-GTT-TG - 3'	20	directe
LML 216	5' -GGA-GCT-GCATGT-GTC-AGA-GG - 3'	20	complementari
ML250	5' -CTC-CGA-GCT-CAT-GGC-TAC-GCA-ACA-ACA-GC - 3'	29	directe
ML264	5' -CCT-CGC-GGC-CGC-TTA-GGT-ACC-ATA-GCA-AGC-AGG-ATT-AGG-TTC - 3'	42	complementari
ML265	5' -CTG-GAT-CCG-TCG-ACG-CCA-TGT-CCG-AGA-CCC-CAT-TAG-TAC-TC - 3'	41	directe
JS7	5' -GCG-AAT-TCA-GGC-GCG-CCA-TGT-CTA-ACC-CTC-AAG-ATG-AC - 3'	38	directe
JS9	5' -GCG-AAT-TCA-GGC-GCG-CCA-TGG-TGA-GTT-CCA-CAG-ACA-CA - 3'	38	directe
JS11	5' -GCC-GTC-GAC-ACT-AGT-TCA-ACC-ACC-ACT-CAT-CGC-CCG - 3'	36	complementari
JS12	5' -GCC-GTC-GAC-ACT-AGT-TCA-GCC-ACC-ACC-AAG-TTC-CAT-GAC - 3'	39	complementari
JS32	5' -GAT-GGA-AGA-CAT-TTC-CGA-CTC - 3'	21	directe
JS33	5' -AAC-TTA-GCT-AGT-CTT-TGA-ATT-G - 3'	22	complementari
JS34	5' -AAT-CGA-GGA-CCT-ATC-CCA-CAA-G - 3'	22	directe
JS35	5' -AGA-TAG-GAG-TGT-GTA-AAT-TGA-TG - 3'	23	complementari
JS40	5' -CTG-CGG-CCG-CAC-TAG-TCT-ATT-CAA-CTC-TTA-TCT-TCT-TTT-TG - 3'	41	complementari
JS41	5' -CCG-TCG-ACC-CAT-GTC-CGA-GAC-CCC-ATT-AGT-ACT-C - 3'	34	directe
JS43	5' -CTG-GTA-CCA-CTA-GTC-TAT-TCA-ACT-CTT-ATC-TTC-TTT-TTG - 3'	39	complementari
JS45	5' -GTT-GTT-CTC-TTT-ACG-GAT-GAC-GCA-CTT-C - 3'	28	directe
JS46	5' -GAA-GTG-CGT-CAT-CCG-TAA-AGA-GAA-CAA-C - 3'	28	complementari

Taula M.III. Encebadors utilitzats en aquest treball. Es mostren tant els encebadors utilitzats en la generació de fragments per clonatge i per ser utilitzats coma sonda, com els comunament utilitzats per comprovar clonatges.

2.- Metodologies

2.1. Tècniques de biologia molecular dels àcids nucleics

2.1.1. Obtenció de DNA plasmídic

Minipreparació de DNA plasmídic. Es realitza amb el kit *QIAprep Spin Miniprep* de Qiagen, seguint les indicacions del fabricant.

2.1.2. Subclonatge de fragments de DNA en vectors

2.1.2.1. Reaccions de modificació del DNA

Per a les reaccions de modificació de DNA realitzades, com ara la digestió de fragments de DNA amb enzims de restricció, lligacions, desfosforilació d'extrems de DNA, etc. s'han utilitzat diferents enzims de restricció de DNA i lligases (Promega, Roche, NewEngland Biolabs), seguint el protocol general descrit per Sambrook (2001) i Ausubel (1989), i les condicions aconsellades pel fabricant en cada cas. És per això que en el present treball només es detallen aquelles que han estat de rellevant importància o bé si el protocol seguit suposa alguna modificació sobre l'original.

2.1.2.2. Transformació de cèl·lules competents d'*E.coli* per xoc tèrmic

La transformació de cèl·lules d'*E.coli* s'utilitza per amplificar DNA plasmídic o per l'expressió heteròloga de proteïnes dependent de la soca. Les cèl·lules competents, preparades segons es descriu a l'apartat 1.1.2, es van transformar per xoc tèrmic segons el següent protocol.

Procediment:

1. Descongelar en gel el tub que conté una alíquota de cèl·lules competents.
2. Afegir 1-5 μ l (10-20 ng) de DNA i barrejar suament.

3. Mantenir la barreja 30 minuts en gel.
4. Fer un xoc tèrmic 2 minuts a 42°C.
5. Transferir el tub a gel durant 2 minuts.
6. Afegir 900 µl de medi LB fresc sense antibiòtics. Posar el tub en agitació a 220rpm a 37°C 1h.
7. Plauejar diferents volums de la transformació en dues plaques de LB sòlid amb l'antibiòtic selectiu escaient.
8. Incubar els bacteris a 37°C O/N.

Les colònies es seleccionen per PCR utilitzant encebadors específics.

2.1.2.3. Transformació de cèl·lules competents d'*A.tumefaciens* per electroporació

La transformació de cèl·lules d'*A.tumefaciens* s'utilitza per augmentar la quantitat de DNA plasmídic, concretament plasmidis binaris, que després s'introduirà a la planta mitjançant transformació per *floral dip* (apartat 2.3.3). Les cèl·lules competents, preparades segons es descriu a l'apartat 1.1.3, es van transformar per electroporació segons el següent protocol.

Procediment:

1. Descongelar una alíquota (50 µl) de cèl·lules electrocompetents en gel i afegir 1-2 µl de DNA (el DNA ha d'estar dissolt en una solució de baixa força iònica, com per exemple TE o H₂O). Barrejar bé i incubar en gel durant 5 minuts.
2. Refredar les cubetes d'electroporació (de 0.1 cm) en gel, prèviament esterilitzades rentant-les amb etanol, i afegir-hi la barreja de cèl·lules i DNA.
3. Electroporar a 1.5 kV. Immediatament, transferir les cèl·lules a un tub amb 1 mL de 2xTY fresc sense antibiòtics.
4. Incubar les cèl·lules a 28°C durant 2h per recuperar-les de l'electroporació.
5. Plauejar diferents volums en medi 2xTY amb els antibiòtics selectius adients.

6. Incubar a 28°C 2-3 dies fins l'aparició de colònies.

Comprovar les colònies per PCR utilitzant encebadors específics.

2.1.3. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Per tal d'amplificar fragments de DNA s'ha emprat el mètode de la reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* o PCR) (Saiki *et al.* 1988), fent servir oligonucleòtids específics i DNA plasmídic complementari (cDNA) o genòmic (segons el cas) com a substrat.

La seva base teòrica es troba descrita en tots els manuals de biologia molecular (Sambrook, 2001).

Per amplificar els fragments per PCR es van utilitzar enzims DNA polimerasa termoestable comercials. Es van utilitzar segons la seva disponibilitat, Pfu DNA Polymerase (Stratagene), Taq Polymerase (Promega) i Go Taq Polymerase (Promega). Totes elles es caracteritzen per tenir una baixa taxa d'error (HF, *High Fidelity*). Aquests enzims disposen dels seus propis tampons i es van utilitzar seguint les instruccions del fabricant.

Els encebadors emprats per les PCR varen ser elaborats per Sigma-Aldrich. Les seves seqüències s'especifiquen a l'apartat 1.4.

2.1.3.1. Retrotranscripció

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per amplificar la primera cadena de cDNAs específics a partir de RNA total. En el nostre treball s'han emprat encebadors homòlegs a la seqüència d'interès. Per la síntesi de la primera cadena de cDNA s'ha utilitzat la *M-MLV Reverse Transcriptase* d'Invitrogen, enzim que permet la transcripció de fragments de RNA de fins a 7 kb a partir de 1 ng-5 µg de RNA.

Procediment:

1. Barrejar en un tub eppendorf RNAsa Free:

X µl RNA (1 µg)

4µl encebador específic complementari 5 µM

fins a 15 µl

Incubar 5 minuts a 70°C. Posar en gel.

2. Afegir al tub:

5 µl RT buffer 5X

1.25 µl dNTPs 10 mM

2 µl DTT 0.1 M

1 µl RT M-MLV

Incubar 1h a 42°C.

3. Inactivar la reacció incubant 10 minuts a 92°C
4. Mantenir en gel fins al moment de fer la PCR, o guardar a 4°C.

A partir del 10% de la reacció de retrotranscripció es varen fer les amplificacions per PCR amb una polimerasa amb baixa taxa d'error (HF, *High Fidelity*).

Solucions:

- **Tampó RT 5X:** Tris Cl pH8 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM.

2.1.3.2. Amplificació per PCR

En cada cicle de PCR hi ha tres etapes que precisen temperatures diferents i es duen a terme en l'aparell de PCR o termociclador, el qual permet una transició molt ràpida entre una temperatura i una altra. Les tres etapes de cada cicle són:

1. Desnaturalització del DNA en presència dels oligonucleòtids encebadors. Es realitza a una temperatura alta, generalment 94°C, durant 30 segons.

2. Hibridació dels encebadors a les seqüències complementàries del DNA motlle a amplificar. Es realitza a la temperatura T_M de l'oligonucleòtid, que ve donada per la seqüència i la llargada d'aquest. Acostuma a estar compresa entre 45 i 65°C. El temps d'hibridació és d'uns 45 segons.

3. Un cop els encebadors s'han unit al DNA, actua la DNA polimerasa termoestable, sintetitzant les cadenes de DNA complementàries en direcció 5' a 3', amb activitat exonucleasa en direcció 3' a 5' *proofreading* per corregir els possibles errors en l'activitat anterior. Aquesta etapa es realitza a 72°C durant un temps que depèn de la mida del fragment a amplificar (aproximadament 1 minut per 1 kb de DNA).

Les condicions generals de PCR emprades per a l'amplificació de DNA, les quals s'han modificat en cada cas per optimitzar la reacció, han estat:

10⁴-10⁶ còpies DNA motlle
 1X Tampó PCR
 1.5 mM MgCl₂
 200 µM dNTPs
 200 nM Encebador directe
 200 nM Encebador complementari
 1-2 unitats DNA polimerasa termoestable
 En H₂O

amb els cicles de PCR

Desnaturalització inicial	5 min. a 94°C	
Desnaturalització	} a 94°C 30 cicles	
Aparellament		45 seg. a 55°C
Extensió		X seg. a 72°C
Extensió final	10 min. a 72°C	

Solucions:

- **Tampó PCR 10X:** Tris Cl pH8 200 mM, KCl 500 mM. Al tampó es pot afegir MgCl₂ 15 mM.

Nota:

En el cas de PCR de colònies, el DNA motlle de la PCR s'hi afegeix picant amb una punta la colònia i submergint la punta a la barreja de PCR.

La comprovació dels fragments amplificats es realitza carregant una part del volum obtingut en un gel d'agarosa (apartat 2.1.4).

Quan va ser necessari, els fragments obtinguts van ser clonats per posteriorment ser seqüenciats (apartat 2.1.5).

2.1.3.3. Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR

Els productes de la reacció de PCR es van purificar utilitzant el kit *QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen*, seguint les indicacions del fabricant, i van ser clonats als vectors descrits a l'apartat 1.4.2.

2.1.4. Separació de DNA en gels d'agarosa

Els productes de PCR o els fragments de DNA procedents de digestions s'han separat en gels d'agarosa/TAE amb agarosa 1% (p/v) i bromur d'etidi 0.05% (p/v), en TAE 1X, al costat d'un marcador de pes molecular adient per a la mida de banda esperada.

Solucions:

- Tampó de càrrega 6X: glicerol 30% (v/v), xilencianol FF 0.25% (p/v), blau de bromofenol 0.25% (p/v), EDTA 0.5M pH 8.
- Tampó TAE 10x: Tris acetat 0.4 M, EDTA 20 mM pH8.

2.1.5. Seqüenciació del DNA

La determinació de les seqüències de DNA preparat com s'indica a l'apartat 2.1.2. ha estat realitzada pel Servei de Seqüenciació del PCB mitjançant seqüenciació automàtica, emprant el sistema Applied Biosystems de Pharmacia (*Automated Laser Fluorescence*). Aquest sistema es basa en el mètode del *dye terminator*. La mitjana de lectura amb aquest mètode va ser de 600-700 pb.

Les seqüències obtingudes han estat processades informàticament mitjançant programes bioinformàtics Vector NTI i programes gratuïts a Internet, com Bioedit, BLAST de l'NCBI, Fasta i Genedoc.

2.1.6. Purificació de fragments de DNA

El DNA va ser purificat seguint diferents protocols segons la seva procedència i la puresa final desitjada. A continuació es presenten els principals mètodes de purificació utilitzats.

Precipitació de DNA

Per la precipitació de fragments de DNA es va seguir el protocol de precipitació d'àcids nucleics per acetat de sodi (Sambrook, 2001).

Procediment:

1. Afegir 1 volum de fenol:cloroform, barrejar amb el vòrtex i centrifugar 5 min. a velocitat màxima. Recuperar la fase aquosa (superior).
2. Afegir 0.1 volums d'AcNa 3M pH 5.2, i 2.5 volums d'etanol absolut.
3. Barrejar i deixar 2-5 min. en gel.
4. Centrifugar 10 min. a velocitat màxima. Descartar el sobrenedant.
5. Afeigr 250 µl d'etanol 70%. Centrifugar 5 min. a velocitat màxima i descartar el sobrenedant.
6. Resuspendre l'àcid nucleic en 50 µl o el volum escaient d'aigua miliQ o tampó TE.

Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa/TAE i productes de PCR

Els fragments de DNA resolts en gels d'agarosa/TAE i els productes de PCR s'han purificat utilitzant el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* de Qiagen, seguint les indicacions del fabricant.

2.1.7. Mutagènesi dirigida per PCR

Mitjançant una reacció de PCR amb els oligonucleòtids adients s'ha realitzat mutagènesi dirigida. El següent esquema representa aquesta tècnica.

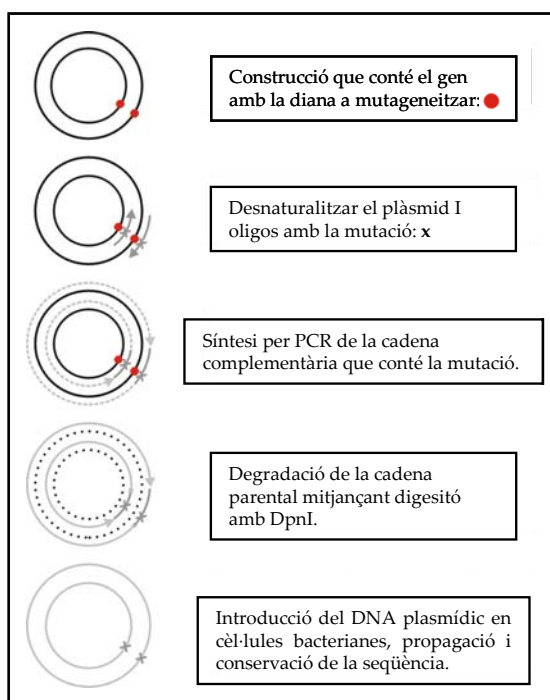


Figura M. I. Representació esquemàtica de la mutagènesi dirigida basada en la PCR. L'enzim de restricció *DpnI* té la particularitat de tallar únicament llocs metilats, atacant exclusivament les cadenes parentals. Aquesta estratègia va ser utilitzada per generar el substrat de SUMO GST-CAT amb la lisina de la seqüència consens de sumoilació mutada.

2.1.8. Obtenció de RNA total d'*Arabidopsis*

En l'aïllament de RNA partim de plàntules d'*Arabidopsis* congelades en nitrogen líquid i emmagatzemades a -80°C . L'extracció de RNA s'ha realitzat amb el kit *RNeasy Mini Kit de Qiagen*, seguint les indicacions del fabricant.

2.1.9. Quantificació d'àcids nucleics

La quantitat de DNA o de RNA present en una mostra es va estimar a partir de la mesura de l'absorbància a 260 nm. La puresa de les mostres d'àcids nucleics es va determinar calculant les relacions entre les absorbàncies a 260 nm i 280 nm. La relació

entre aquestes dues absorbàncies indica la presència de proteïnes si dóna fora del rang de 1.7-2.

2.1.10. Anàlisi de l'RNA per northern-blot

Preparació de les mostres

Les mostres es preparen en un volum de 5 µl (10 µg de RNA total). Les mostres es desnaturalitzen 10 min. a 70°C i es mantenen en gel fins al moment de carregar-les, quan els afegim 15 µl de tampó de càrrega.

Preparació del gel d'agarosa al 1% i electroforesi

El gel es prepara fonent 0.35 g d'agarosa en 26 mL d'aigua i 7 mL de MOPS 5X. Es deixa refredar fins aproximadament 65°C i s'afegeixen 1.9 mL de formaldehid al 37.5%. Es barreja bé i s'aboca al portagels. El tampó d'electroforesi és MOPS 1X, que s'afegeix fins al nivell del gel, sense arribar a cobrir-lo. Es carreguen les mostres i s'acaben de cobrir els pou amb tampó MOPS 1X, i es corre l'electroforesi a 50V durant 2h en campana de gasos.

Transferència a membrana de niló

Després de l'electroforesi el gel de RNA es renta amb aigua durant 10 min. per tal d'eliminar l'excés de formaldehid, i es procedeix a transferir l'RNA a una membrana de niló per capil·laritat en presència d'un tampó d'elevada força iònica (SSC 10x).

1. Col·locar el gel invertit sobre un paper Whatman 3MM prèviament mullat amb el tampó, que fa de pont per a l'absorció per capil·laritat del tampó de transferència SSC 10X. Les bombolles que puguin quedar entre el gel i el paper Whatman s'eliminen amb l'ajut d'una vareta de vidre.
2. Humitejar la membrana de niló de la mida del gel en aigua i col·locar sobre el gel, eliminant les bombolles de la manera descrita anteriorment.
3. Humitejar un paper Whatman 3MM de la mida del gel, col·locar-lo sobre la membrana de niló i eliminar les bombolles.
4. Afegir uns quants papers Whatman 3MM secs i una pila de papers absorbents.

5. Col·locar un vidre al damunt i un pes per a fer pressió sobre el gel. Deixar transferint O/N a TA.

6. Retirar la membrana de niló i fixar l'RNA a la membrana amb un aparell *stratalinker* (Stratagene) que uneix covalentment l'RNA a la membrana mitjançant radiació UV.

Solucions:

- **Tampó de càrrega per RNA (1.5 mL):** 720 µl formamida desionitzada, 260 µl formaldehid 37.5%, 310 µl MOPS 5X, 80 µl glicerol, 15 µl blau de bromofenol saturat (4% en aigua), 50 µl bromur d'etidi (1mg/mL), 55 µl aigua.
- **Tampó SSC 20X** (filtració): NaCl 3M, C₆H₅Na₃O₇·2H₂O (citrat trisòdic) 0.3M.
- **Tampó MOPS 5X**(autoclau): MOPS 0.2M, AcONa 51mM pH 5.3, EDTA 5mM pH 8.

2.1.11. Obtenció de sondes de DNA i marcatge radioactiu

2.1.11.1. Generació de sondes de DNA

Les sondes per a les hibridacions northern-blot es van generar amplificant per PCR DNA genòmic de l'ecotip Col-0 amb encebadors específics per a cada gen. Els productes de PCR es van subclonar al vector pBSK+ (apartat 1.3.2). La identitat dels inserts es va confirmar per seqüenciació i posteriorment s'aïllaren per digestió amb enzims de restricció o per PCR amb encebadors específics. Aquests productes són els que es marcaren radioactivament. A la següent taula es mostren les diferents sondes generades i la forma d'aïllament.

GEN	PLASMIDI	AÏLLAMENT
Sae1a	pBSK+	Digestió EcoRI o PCR (JS32 (D) i JS33(C))
Sae1b	pBSK+	Digestió EcoRI o PCR (JS34 (D) i JS35(C))

Taula M. IV. Sondes radioactives utilitzades en aquest treball. D, directe. C, complementari.

2.1.11.2. Marcatge radioactiu de fragments de DNA per *random priming*

Basat en el mètode descrit per Feinberg i col. (1983), es va utilitzar el kit comercial *Ready-To-Go Labelling Beads* de GE Healthcare i s'han seguit les indicacions del fabricant. Permet l'obtenció de fragments de DNA marcats uniformement i amb una elevada activitat específica (fins a 3.109 cpm/ μg DNA). S'utilitzen hexanucleòtids (2 μL) de seqüència a l'atzar, que hibriden amb les seqüències de DNA del nostre fragment a marcar. Un cop reconegudes les seqüències de DNA, la polimerasa (1 μL Klenow) omple els forats amb els nucleòtids afegits a la reacció (3 μL d'A, T, GTPs + 2 μL α 32-dCTP (3000 Ci/mmol)), incubant 30 min. a 37°C. Es purifica la sonda eliminant els nucleòtids no incorporats en una microcolumna de Sephadex G-50 (*illustra ProbeQuant G-50*, GE Healthcare).

2.1.12. Hibridació de membranes northern-blot amb sondes de DNA

Procediment:

1. Prehibridar la membrana durant 30min. en un volum de 10 mL de tampó *Express HYB* (Clontech) dins d'un cilindre d'hibridació a 65°C.
2. Desnaturalitzar la sonda radioactiva durant 3 min. a 100°C just abans d'utilitzar-la. Posar-la immediatament en gel.
3. Afegir la sonda radioactiva al tampó *Express HYB* (Clontech).
4. Hibridar la membrana a 65°C un mínim de 5h (es recomana deixar-la O/N).
5. Fer 3 rentats de 20 min. amb tampó de rentat a 65°C.
6. Segellar la membrana dins una bossa de plàstic i exposar sobre una pantalla *phosphorimager*.

Solucions

- Tampó de rentat: SSC 2X, SDS 0.5% (p/v).

2.2. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR DE PROTEÏNES

2.2.1. Obtenció d'extractes proteics

Per a l'extracció de proteïnes es va utilitzar el següent mètode:

Procediment:

1. Pesar la mostra.
2. Afegir 2µl de tampó d'extracció PE per mg de mostra.
3. Triturar la mostra en el tampó i deixar l'eppendorf en agitació 2h a 4°C.
4. Centrifugar 10 min. a 4°C a màxima velocitat i recuperar el sobrenedant.
5. Mesurar la quantitat de proteïnes presents a la mostra (apartat 2.2.2).
6. Congelar amb nitrogen líquid i conservar la mostra a -80°C.

Solucions:

- Tampó d'extracció PE: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tritó X-100 0.2% (p/v) i inhibidors de proteases (PMSF (*phenylmethanesulphonylfluoride*) 1 mM, Pepstatin 1 µg/mL, Leupeptin 1 µg/mL, NEM (N-etilmaleimida) 2 mM, Iodoacetamida 10 mM).

2.2.2. Quantificació de proteïnes

Les mostres extretes segons el protocol anterior van ser quantificades segons el mètode espectrofotomètric de Bradford amb el reactiu *Biorad Protein Assay*. En cada cas s'han realitzat repliques de les mostres a mesurar. Les mesures s'han realitzat en un lector de ELISA a una longitud d'ona de 595nm.

2.2.3. Separació electroforètica de proteïnes

Les proteïnes es van separar mitjançant electroforesi desnaturalitzant per proteïnes (SDS-PAGE) seguint el protocol descrit a Sambrook (2001) i fent servir l'aparell vertical Hoefer o Biorad, seguint les instruccions del fabricant.

Procediment:

1. Armar el sistema de preparació de gels.
2. Afegir el gel separador fins a 7 cm d'alçada. Afegir unes gotes d'isopropanol per cobrir la superfície exposada a l'oxigen atmosfèric, que inhibiria la polimerització. Deixar polimeritzar 1h.
3. Treure l'isopropanol. Afegir el gel apilador fins a l'extrem superior dels vidres i encaixar immediatament la pinta corresponent amb el número de pous adequat. Deixar polimeritzar el gel 1h. S'han utilitzat vidres de 0.75 mm de gruix.
4. Col·locar el gel al suport corresponent en la cubeta d'electroforesi. Afegir tampó d'electroforesi 1x fins vessar els pouets.
5. Preparar les mostres segons es descriu a l'apartat 2.2.1. i afegir el volum adequat de tampó de càrrega 6x. Bullir les mostres 5 min. a 95°C.
6. Carregar el gel amb les mostres. Aplicar el voltatge apropiat per la correcta separació de les proteïnes. Es van fixar amperatges de 20-40 mA, segons el número de gels que estaven migrant al sistema (1 ó 2). Un cop el front de migració arriba a l'extrem inferior del gel, aturar l'electroforesi.

Solucions:

- Tampó d'electroforesi 10x: Tris base 0.25 M, Glicina 1.92 M, SDS 1% (p/v).
- Tampó de càrrega 6x: Tris-HCl 0.35M pH 6.8, 30% glicerol (v/v), SDS 10% (p/v), DTT 0.6 M, blau de bromofenol 0.012% (p/v).

2.2.4. Anàlisi de proteïnes per transferència i immunodetecció (*Western-blot*)

A partir d'un gel SDS-PAGE s'ha realitzat la transferència de les proteïnes a membranes de PVDF seguint el mètode semi-sec descrit per Polvino *et al.* (1983). Es va fer servir l'aparell *Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Cell* de BioRad seguint les instruccions del fabricant.

La detecció de les proteïnes es va fer per quimioluminescència utilitzant un anticòs primari específic contra la proteïna a detectar i un anticòs secundari anti-anticòs primari conjugat amb una peroxidasa de rave (GE Healthcare), que hidrolitza el reactiu quimioluminescent ECL Plus (*ECL Plus Western Blotting detection reagents*, GE Healthcare).

Procediment:

1. Recuperar el gel SDS-PAGE i descartar el gel apilador.
2. Rentar 10 seg. en metanol absolut la membrana de PVDF d'igual mida al gel separador. Eliminar el metanol sobrant de la membrana rentant 10 seg. amb H₂O miliQ i finalment mantenir-la en tampó de transferència.
3. Acoblar la membrana al gel entre fragments de paper gruixut absorbent de la mateixa mida i prèviament equilibrats amb tampó de transferència.
4. Col·locar el muntatge en l'aparell de transferència i ajustar un voltatge de 20V durant 50 min.
5. Recuperar la membrana.
6. Bloquejar amb tampó TBST 1x + 3% (p/v) de llet desnatada en pols durant 1h a TA en agitació.
7. Retirar el bloqueig i afegir l'anticòs primari a la dilució corresponent en tampó TBST+3% de llet en pols a TA durant 1h en agitació. Es pot substituir aquesta incubació d'1h per O/N a 4°C.
8. Rentar la membrana amb TBST amb dos rentats ràpids i altres dos de 10 min. a TA i en agitació.

9. Incubar la membrana 45min. a TA amb el corresponent anticòs secundari en tampó TBST + 3% de llet en pols.
10. Repetir el pas 3 de rentats.
11. Eixugar la membrana per treure l'excés de TBST i afegir el reactiu ECL Plus. Revelar la membrana amb l'ajut de l'equip LAS-300 (Fujifilm Life Science Products) variant els temps d'exposició fins aconseguir una resolució i contrast òptims de la imatge.

Solucions:

- Tampó de transferència: Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 10% (v/v).
- Tampó TBST: Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 20 mM, Tween20 0.1% (v/v).

2.2.4.1. Anticossos utilitzats

Anticossos primaris:

- Anti-SUMO. Anticòs policlonal. Dilució de treball 1:1000.
- Anti-SAE2: Anticòs policlonal. Dilució de treball 1:2000.
- Anti-SCE: Anticòs policlonal. Dilució de treball 1:1000.
- Anti-GST: Anticòs policlonal. Dilució de treball 1:2500.

Anticossos secundaris:

- Anti-rabbit: Anti sèrum de conill unit a la peroxidasa de rave. Dilució de treball el doble de la dilució de l'anticòs primari utilitzat.

2.2.4.2. Tinció de proteïnes

La tinció de gels es va realitzar amb la solució de tinció Coomassie. La tinció de membranes es va realitzar amb dues solucions de tinció, una basada en el blau de Coomassie, igual que els gels, i l'altra basada en la solució de tinció Ponceau. Aquesta última és més dèbil però s'elimina fàcilment amb aigua i no interfereix amb la

incubació amb anticossos. S'utilitza per comprovar l'eficiència de la transferència de proteïnes des del gel a la membrana.

Procediment:

1. Col·locar la membrana en solució de tinció durant 10 min. a TA i en agitació.
2. Treure la solució de tinció i afegir la solució de destinció (aigua en el cas de Ponceau). Mantenir en agitació i reemplaçar la solució de destinció tantes vegades com sigui necessari fins que la relació entre la intensitat de les bandes i el soroll de fons resulti òptima.

Solucions:

- Ponceau: vermell Ponceau 0.5% (p/v), àcid acètic glacial 1% (v/v).
- Coomassie: metanol 40% (v/v), àcid acètic glacial 10% (v/v), blau de Coomassie R-250 0.1% (p/v).
- Solució destinció Coomassie: etanol 40% (v/v), àcid acètic glacial 3% (v/v).

2.2.5. Expressió heteròloga de proteïnes a *E.coli*.

La soca BL21 RIL d'*E.coli* va ser utilitzada per l'expressió de proteïnes. Després de transformar aquestes cèl·lules amb la construcció d'interès, es van sembrar en plaques amb el corresponent antibiòtic per tal d'obtenir colònies aïllades.

Procediment:

1. Crèixer tota la nit a 37°C un precultiu, obtingut a partir d'una colònia aïllada, en 60 mL de 2xTY amb el corresponent antibiòtic.
2. Inocular dos erlenmeiers amb 500 mL de 2xTY amb una dilució 1/50 del precultiu anterior i incubar a 37°C fins que el cultiu arribi a una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.6-0.8.
3. Induir durant 4 hores l'expressió de la proteïna, afegint al cultiu 0.1mM final d'IPTG.
4. Centrifugar a 6000 rpm durant 10 minuts a 4°C.
5. Resuspendre el sediment anterior en 1/10 del volum del cultiu bacterià original de tampó de lisi.

6. Incubar 30 minuts a 4°C.
7. Sonicar; s'apliquen 3 polsos de 30 segons a 30W amb 1 minut d'interval entre ells.
8. Centrifugar a 18000 rpm durant 20 minuts a 4°C.
9. El sobrenedant és filtrat amb un filtre de 0.45 µm i és destinat per a la purificació de la proteïna d'interès segons el mètode escaient.

Solucions:

- Tampó de lisi: Tris-HCl pH8 50 mM, NaCl 0.35 M, MgCl₂ 10 mM, β-mercaptoetanol 1 mM, NP40 0.1% (v/v), DNasa 50 µg/µl, lisozima 1 mg/mL i inhibidors de proteases (PMSF (*phenylmethanesulphonylfluoride*) 1 mM, Pepstatin 1 µg/mL, Leupeptin 1 µg/mL.

2.2.6. Purificació de proteïnes

Proteïnes fusionades a cua d'histidines

La sobreexpressió de proteïnes fusionades a una cua d'histidines ens permet purificar-les mitjançant una resina Ni-NTA. Les cèl·lules transformades amb el vector desitjat van ser crescudes i lisades tal com es descriu a l'apartat 2.2.5. Es va empaquetar en una columna 3mL d'una suspensió 50% de resina Ni-NTA. Posteriorment es va procedir a la purificació del lisat del cultiu.

Procediment:

1. Equilibrar la columna amb 15 mL del tampó de rentat.
2. Carregar la barreja de lisat en la columna.
3. Rentar la columna amb 15 mL del tampó de rentat.
4. Repetir el pas anterior dues vegades.
5. Eluir la proteïna amb fraccions d'1 mL de tampó d'elució. Les diferents fraccions es recullen en diferents tubs i són analitzades per SDS-PAGE.
6. Les fraccions d'interès van ser purificades per cromatografia d'exclusió molecular. Es va utilitzar una columna superdex 75 i el procés complet va ser realitzat amb un sistema

automatitzat FPLC (GE Healthcare). Les mostres van ser centrifugades a màxima velocitat i filtrades amb filtres de 0.2 µm abans de ser injectades al sistema FPLC.

Solucions

- Tampó de rentat: Tris-HCl pH8 50 mM, NaCl 350 mM, β-mercaptoetanol 1 mM, Imidazol 20 mM.
- Tampó d'elució: Tris-HCl pH8 50 mM, NaCl 350 mM, β-mercaptoetanol 1 mM, Imidazol 300 mM.

Nota:

En el cas de l'E1 es van coexpressar la subunitat gran (AtSAE2) i la subunitat petita (AtSAE1). El lisat d'aquests cultius es va purificar mitjançant cromatografia d'afinitat a níquel. Posteriorment es va substituir la cromatografia d'exclusió molecular per una de bescanvi iònic (columna Mono Q, GE Healthcare).

Proteïnes fusionades a la proteïna GST

La sobreexpressió de proteïnes fusionades a la proteïna GST ens permet purificar-les mitjançant una resina glutatió agarosa. Les cèl·lules transformades amb el vector desitjat van ser crescudes i lisades tal com es descriu a l'apartat 2.2.5. Es va empaquetar en una columna 3mL d'una suspensió 50% de resina glutatió agarosa. Posteriorment es va procedir a la purificació del lisat del cultiu seguint els mateixos passos descrits anteriorment. Al basar-se la cromatografia d'afinitat en altre tipus d'afinitat, els tampons de rentat i elució són diferents.

Solucions

- Tampó de rentat: Tris-HCl pH8 50 mM, NaCl 350 mM.
- Tampó d'elució: Tris-HCl pH8 50 mM, NaCl 350 mM, glutatió reduït 10 mM.

2.2.7. Desnaturalització de proteïnes induïda per calor

La desnaturalització de proteïnes induïda per calor i la seva monitorització per calorimetria diferencial de rastreig va ser realitzada amb els serveis científicotècnics del Parc Científic de Barcelona (SCT-PCB).

2.2.8. Assaig de sumoilació *in vitro*

El assajos de conjugació de SUMO *in vitro* emprats en aquesta tesi contenen AtE1 0.5 μ M, AtE2 0.5 μ M, AtSUMO 2 μ M, GST-CAT 5 μ M al tampó de reacció (ATP 1 mM, NaCl 50 mM, Hepes 20 mM, Tween-20 0.1% (v/v), MgCl₂ 5 mM). L'assaig es va realitzar en un volum de 25 μ l. La reacció de sumoilació va ser incubada a diferents temps (de 10 a 60 minuts) i temperatures (de 22 a 48°C). Les reaccions van ser aturades bullint la mostra i barrejant-les en tampó de càrrega. Alíquotes de 10 μ l de la reacció van ser analitzades en SDS-PAGE 12% i *western blot* amb anticòs anti-GST.

2.3. MÈTODES DE PLANTES

2.3.1. Esterilització de llavors

Les llavors d'*Arabidopsis* van ser esterilitzades en tots aquells experiments que implicaven sembrar-les per al cultiu en placa.

Procediment:

1. Realitzar 3 rentats amb solució d'esterilització. Entre un rentat i el següent agitar vigorosament amb vòrtex.
2. Deixar les llavors en la solució d'esterilització durant 10 min. en agitació.
3. Realitzar 3 rentats amb aigua estèril miliQ.
4. Retirar l'aigua estèril.

Solucions:

- **Solució d'esterilització:** Lleixiu 50% (v/v), Tritón X-100 0.01% (v/v).

2.3.2. Sembra de llavors

Dependent del tipus d'experiment que s'hagi dut a terme, les llavors s'han sembrat de la següent manera:

Sembra de llavors en grup sobre el medi de cultiu

Unes 1000-2000 llavors es sembren en grup directament sobre el medi de cultiu quan es tracta de llavors de la generació T1, procedents de plantes transformades amb agrobacteri, d'entre les quals es volem seleccionar aquelles que continguin el transgen.

Procediment:

1. Resuspendre les llavors en 2.5 mL d'una solució estèril d'agarosa 0.1% (p/v), que permet que les llavors s'escampin per la superfície del medi sense que s'agreguin.
2. Abocar les llavors en la solució d'agarosa sobre el medi sòlid MS 0.5x amb l'antibiòtic de selecció corresponent i l'antibiòtic cefotaxima per eliminar les possibles restes d'agrobacteri, escampar-les per tota la placa i deixa-les assecar sota la campana amb les plaques obertes.

Sembra de llavors una a una sobre el medi de cultiu

Les llavors es sembren d'una en una directament sobre el medi de cultiu quan es tracta de facilitar el seu recompte (per exemple, en els estudis de segregació d'un transgen) o per als experiments fisiològics (apartat 2.3.5) en una densitat de 100 llavors per placa.

Procediment:

1. Resuspendre les llavors en aigua estèril.
2. Pipetejar les llavors amb una pipeta P1000 i deixar-les anar una a una sobre el medi sòlid corresponent contactant la punta de la pipeta amb el medi.

Independentment del sistema de sembra utilitzat, un cop sembrades les llavors, les plaques es segellen amb cinta porosa *micropore* i s'emmagatzemen en foscor a 4°C durant entre 3 i 5 dies. Aquest procés, conegut com estratificació, permet el trencament de la dormància de les llavors, assegurant la germinació sincronitzada de totes les llavors quan les posem en les condicions de llum i temperatura indicades a l'apartat 1.2.4.

2.3.3. Obtenció de plantes transgèniques. Transformació de plantes d'*Arabidopsis*

Plantes d'*Arabidopsis* de l'ecotip silvestre Col-0 es van transformar per *floral dip* segons el mètode descrit per (Clough i Bent 1998), amb un cultiu d'*A.tumefaciens* portador de la construcció que en cada cas es volia introduir a la planta (apartat 1.4.1.3).

Procediment:

1. Cultivar les plantes d'*Arabidopsis* a transformar en testos a l'hivernacle. En testos de 11.5 cm de diàmetre amb la barreja de substrat coberta per una reixeta, es sembren unes 8-10 llavors, densitat que permetrà un creixement òptim de la planta.
2. Quan les plantes han desenvolupat inflorescències de 5-7 cm (aproximadament 6 setmanes després de la sembra), tallar les inflorescències a ran de roseta (tallar la inflorescència principal de la planta fa que es formin noves tiges florals laterals, d'aquesta manera augmenten el número de tiges florals susceptibles a ser transformades). Després de 9-10 dies aquestes tiges florals estan en un estadi òptim per a la transformació.
3. Dos dies abans de la transformació, inocular 2 mL de medi 2xTY amb els antibiòtics adequats amb la soca de l'agrobacteri portadora de la construcció a transformar. Incubar O/N a 28°C en agitació.
4. Inocular un cultiu de 1 L de medi 2xTY amb els antibiòtics adequats amb 1 mL del precultiu. Incubar O/N a 28°C en agitació.
5. Centrifugar el cultiu 10 minuts a 4000xg. Descartar el sobrenedant.
6. Resuspendre les cèl·lules en 300 mL de sacarosa 5% (p/v).
7. Just abans de transformar les plantes afegir 0.02% (v/v) de Silvet al cultiu d'agrobacteri.
8. Abocar el cultiu en un recipient adequat i submergir-hi les inflorescències de les plantes durant 10 segons. Convé regar les plantes abans de la transformació, perquè l'aigua saturarà el substrat en cas de que aquest entri en contacte amb la solució d'agrobacteri i no l'absorbirà, implicant futures contaminacions en les plantes. La reixeta que hem posat als testos en el moment de la sembra també impedeix el contacte del substrat amb la solució d'agrobacteri al posar els testos boca avall en el moment de la transformació.
9. Deixar els testos en posició horitzontal en una safata sobre paper de filtre, que absorbirà l'excés d'agrobacteri, i cobrir-la amb un plàstic.
10. Mantenir la safata durant 2-4 dies al fitotrò amb baixa intensitat de llum.

11. Passat aquest temps, retirar el plàstic que cobreix la safata, el paper de filtre i posar les plantes en posició vertical per a ser cultivades normalment a l'hivernacle.

12. Recollir les llavors d'aquestes plantes transformades (T1) i sembrar-les en medi MS amb l'antibiòtic de selecció adequat més cefotaxima.

13. Repetir el pas anterior amb la següent generació de llavors (T2).

14. Repetir un altre cop el pas anterior per analitzar la generació T4 i seleccionar els individus homozigots per al transgen, és a dir, els que presenten una descendència 100% resistent.

2.3.4. Anàlisi molecular de les plantes mutants

2.3.4.1. Obtenció de DNA genòmic de planta

Per a l'extracció del DNA genòmic de les plantes hem seguit el protocol descrit per Edwards *et al.* (1991).

Procediment:

1. Macerar el teixit (una fulla jove, síliqua o unes quantes llavors) en un tub eppendorf durant més de 15 segons amb un èmbol de plàstic (*pellet pestle polypropylene*, SIGMA-Aldrich).
2. Afegir 400 µl de tampó d'extracció, i acabar de macerar el teixit.
3. Barrejar amb el vòrtex.
4. Centrifugar 1 minut a 13000 rpm.
5. Descartar el sediment.
6. Barrejar el sobrenedant (400 µl) amb 400 µl d'isopropanol.
7. Incubar a TA durant 2 min.
8. Centrifugar 5 minuts a 13000 rpm.
9. Descartar el sobrenedant.

10. Rentar el sediment amb 700 µl d'etanol 70%.
11. Centrifugar 5 minuts a 13000 rpm.
12. Descartar el sobrenedant.
13. Resuspendre el sediment en 100 µl d'aigua destil·lada. Guardar a -20°C.

Solucions:

- **Tampó d'extracció:** Tris-HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM i SDS 0.5%.

2.3.4.2. Comprovació del genotip per PCR

La tècnica de la PCR s'utilitza per detectar ràpidament la presència d'un transgen introduït a la planta. Aquesta tècnica també s'usa per genotipar les plantes mutants procedents de col·leccions d'inserció d'un T-DNA (SALK), utilitzant oligonucleòtids de l'element d'inserció de cada línia i de la regió genòmica flanquejant al seu lloc d'inserció.

La reacció de PCR utilitza com a motlle 5 µl de DNA procedent de l'extracció de DNA genòmic (apartat 2.3.4.1) i una parella d'encebadors adequada.

2.3.5. Tractaments d'estrès

Les plantes van ser sotmeses a diferents estressos:

Xoc tèrmic: Plantes de 10 dies d'edat cultivades en règim de dia llarg en medi de cultiu líquid Gamborg B5 van ser sotmeses a una temperatura de 42°C durant 30 minuts. Immediatament després del tractament, les mostres van ser congelades amb N₂ líquid i guardades a -80°C. En les mostres indicades es va deixar un temps de 30 minuts de recuperació a temperatura ambient abans de congelar les plantes. Les mostres van ser utilitzades per realitzar extracció de proteïnes i el seu posterior anàlisi per *western blot*.

Xoc hídric: Es va separar la roseta de plantes de 16 dies d'edat cultivades en medi sòlid MS. La roseta es va deixar en una campana de flux laminar durant els diferents

temps desitjats. Després del tractament les plantes van ser congelades immediatament amb N₂ líquid i guardades a -80°C. Les mostres van ser utilitzades per experiments d'immunodetecció.

2.3.6. Mesura mida roseta

Les plantes han estat cultivades a terra a 22°C de temperatura en règim de dia curt. S'ha mesurat l'àrea que ocupa la roseta de cada planta amb l'ajut del programa gratuït Image J. Els valors s'han referenciat a l'àrea corresponent a les plantes Col-0.

2.3.7. Microbombardeig

Per als estudis de localització cel·lular es van bombardejar cèl·lules epitelials de ceba amb micropartícules de tungstè. El sistema de bombardeig utilitza la pressió de l'heli per accelerar les micropartícules recobertes de DNA i introduir-les directament sobre les cèl·lules de ceba, transformant-les.

Procediment:

1. Preparació dels micropojectils:
 - 1.1 Pesar 30 mg de micropartícules de tungstè en un tub eppendorf de 1.5 mL.
 - 1.2 Afegir 1 mL d'etanol al 70%. Agitar al vòrtex durant 3-5 minuts.
 - 1.3 Incubació 15 minuts a TA.
 - 1.4 Precipitar les micropartícules mitjançant un pols de centrifuga de 5 segons. Descartar el sobrenedant.
 - 1.5 Afegir 1 mL de H₂O estèril i agitar al vòrtex 1 minut. Deixar incubant les micropartícules 1 minut fins que sedimentin. Finalment repetir el pols de centrifuga i descartar el sobrenedant.
 - 1.6 Repetir el pas anterior 2 cops més.
 - 1.7 Afegir 0.5 mL de glicerol 50% estèril. Conservar a -20°C per prevenir l'oxidació.
2. Precipitació del DNA sobre els microprojectils.
 - 2.1 Mantenir les micropartícules preparades segons el pas anterior en una plataforma vòrtex. Es convenient deixar-les el temps suficient (mínim 5 minuts) per poder resuspendre i trencar els aglomerats de micropartícules.

- 2.2 Transferir 10 µl de micropartícules a un tub eppendorf.
 - 2.3 Mantenir en agitació el tub anterior i s'afegeix:
 - 1-2 µg de DNA plasmídic.
 - 17.5 µl de solució de precipitació (12.5 µl de CaCl₂ M, 5 µl espermidina 0.1M).
 - 2.4 Mantenir agitant amb el vòrtex durant 3 minuts.
 - 2.5 Deixar 1 minut sedimentant les micropartícules.
 - 2.6 Precipitar les micropartícules amb un pols de centrífuga de 5 segons i descartar el sobrenedant.
 - 2.7 Rentar el precipitat amb etanol 70%. Retirar el sobrenedant.
 - 2.8 Rentar el precipitat amb etanol absolut. Descartar el sobrenedant.
 - 2.9 Resuspendre en 20 µl d'etanol absolut.
3. Microbombardeig.
- 3.1 Dipositar 6 µl de micropartícules recobertes de la mostra de DNA amb la qual es vol transformar sobre una membrana portadora.
 - 3.2 Ajustar la bombona d'heli a una pressió de 1300 psi, unes 200 psi per sobre de la suportada pel disc de ruptura.
 - 3.3 Ajustar la membrana portadora correctament orientada sobre el suport metàl·lic.
 - 3.4 Col·locar una reixeta d'aturada a la plataforma. A continuació, el suport metàl·lic amb la membrana portadora de manera que les micropartícules quedin orientades cap a la reixeta.
 - 3.5 Tancar el muntatge enroscant la tanca del suport metàl·lic.
 - 3.6 Col·locar el disc de ruptura al suport corresponent i s'enrosca al tub d'acceleració del gas, a l'extrem superior de la cambra de bombardeig.
 - 3.7 Seguidament, col·locar la plataforma amb la membrana al nivell adient.
 - 3.8 Finalment, col·locar la plataforma amb la mostra vegetal al corresponent nivell.
 - 3.9 Tancar la cambra de bombardeig i engegar la bomba de buit.
 - 3.10 Connectar la cambra de bombardeig i engegar el interruptor de buit.
 - 3.11 Quan la pressió de buit arribi a 27-29 mm de Hg (0.06 atm), passar el interruptor a la posició inferior, en la qual es manté la pressió de buit.
 - 3.12 Prémer el interruptor de disparar. La pressió d'heli indicada al manòmetre del sistema s'anirà acumulant sobre el disc de ruptura fins arribar al màxim suportat, moment en el que es trencarà, emetent un soroll i baixant la pressió d'heli des de 1100 psi fins a 0.

- 3.13. Alliberar el buit immediatament. Es convenient realitzar els passos 11 a 13 el més ràpid possible per tal de reduir els danys que el buit pot causar al teixit vegetal.
- 3.14 Finalment, recuperar la mostra bombardejada. Es deixa incubar 24 hores en foscor i embolicada amb paper humit a temperatura ambient per a que es doni l'expressió de la construcció bombardejada.
- 3.15 Descartar el disc de ruptura, la membrana portadora i la reixeta.
- 3.16 Abans de procedir a un nou bombardeig, esterilitzar i rentar de nou la zona.
- 3.17 Un cop acabat l'experiment, es convenient tancar la maneta de l'heli, aplicar el buit per poder disparar i així alliberar el gas retingut al sistema.

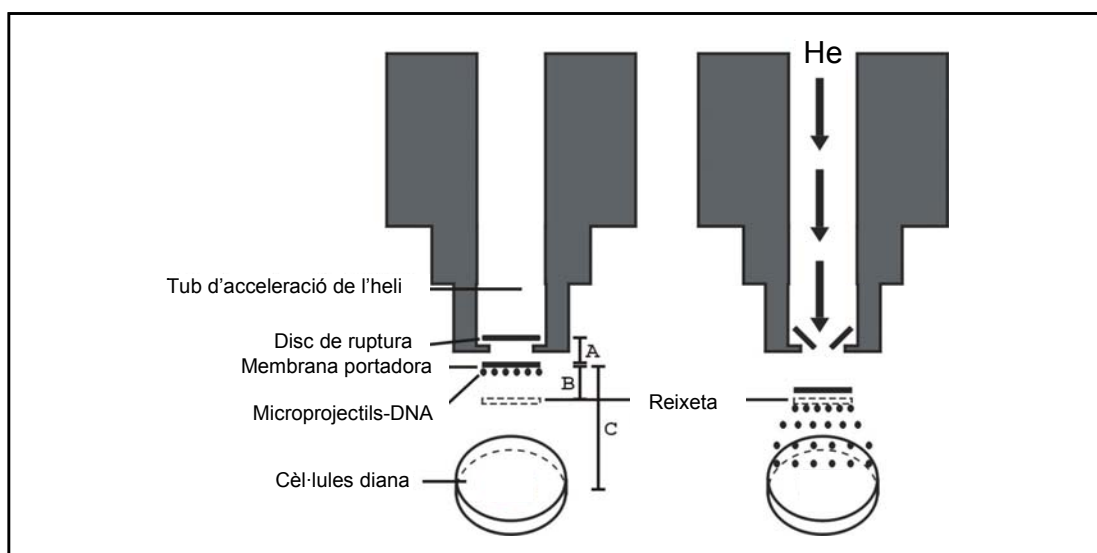


Figura M.II. Representació esquemàtica del sistema de biolística, abans i després d'aplicar la pressió d'heli.

2.3.7.1. Observació de les mostres microbombardejades

Les mostres obtingudes després del procés de transformació transitòria mitjançant el sistema de biolística van ser examinades al microscopi làser de escàner confocal (Olympus FV 1000). Ocasionalment es va efectuar una observació preliminar amb l'ajuda de la lupa binocular de fluorescència Olympus DP71, amb l'objectiu de detectar a la mostra regions amb un gran número de cèl·lules transformades. L'anàlisi i el

tractament de les imatges obtingudes va ser efectuat mitjançant l'aplicació Fluo-View (Olympus).

2.4. Assaig doble híbrid de llevat

Es van introduir les diferents construccions dels vectors pGBKT7 i pGADT7 (apartat 1.4.2) en la soca de llevat HF7c pel mètode d'acetat de liti descrit a l'apartat 1.3.2. Es va ajustar la DO_{600} a 1 i es van sembrar 5 μ l de les dilucions 1, 1/8, 1/32 i 1/64 en plaques de medi SD (-Leu, -Trp) i SD (-Leu, -Trp, -His) de les diferents soques transformades. Les plaques es van incubar 2 dies a 30°C. La capacitat de la soca de llevat HF7c per créixer en absència d'histidina es va utilitzar com a indicador d'interacció entre proteïnes

3. Bioinformàtica

A més dels programes i softwares especificats en els diferents apartats anteriors, en aquesta tesi s'han utilitzat les següents eines bioinformàtiques:

- Genevestigator: (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) (Zimmermann *et al.* 2004).
- BAR (<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Winter *et al.* 2007).
- Predicció NLS. Programa NLS PSORTII (<http://psort.nibb.ac.jp>).
- SWISS-MODEL. (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>).

7. BIBLIOGRAFIA

- al-Khodairy, F., T. Enoch, I. M. Hagan i A. M. Carr** (1995). "The Schizosaccharomyces pombe hus5 gene encodes a ubiquitin conjugating enzyme required for normal mitosis." J Cell Sci **108** (Pt 2): 475-86.
- Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, et al.** (2003). "Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana." Science **301**(5633): 653-7.
- Amasino, R.** (2004). "Take a cold flower." Nat Genet **36**(2): 111-2.
- Anckar, J. i L. Sistonen** (2007). "SUMO: getting it on." Biochem Soc Trans **35**(Pt 6): 1409-13.
- Ausebel, F.** (1989). "Current protocols in Molecular Biology". Greene Publishing Association, Brooklyn, NY.
- Azpiroz, R., Y. Wu, J. C. LoCascio i K. A. Feldmann** (1998). "An Arabidopsis brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation." Plant Cell **10**(2): 219-30.
- Bachmair, A., M. Novatchkova, T. Potuschak i F. Eisenhaber** (2001). "Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification." Trends Plant Sci **6**(10): 463-70.
- Bayer, P., A. Arndt, S. Metzger, R. Mahajan, F. Melchior, R. Jaenicke i J. Becker** (1998). "Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1." J Mol Biol **280**(2): 275-86.
- Bernier-Villamor, V., D. A. Sampson, M. J. Matunis i C. D. Lima** (2002). "Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1." Cell **108**(3): 345-56.
- Boddy, M. N., K. Howe, L. D. Etkin, E. Solomon i P. S. Freemont** (1996). "PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia." Oncogene **13**(5): 971-82.
- Bohren, K. M., V. Nadkarni, J. H. Song, K. H. Gabbay i D. Owerbach** (2004). "A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus." J Biol Chem **279**(26): 27233-8.
- Brzovic, P. S., A. Lissounov, D. E. Christensen, D. W. Hoyt i R. E. Klevit** (2006). "A UbcH5/ubiquitin noncovalent complex is required for processive BRCA1-directed ubiquitination." Mol Cell **21**(6): 873-80.

- Budhiraja, R., R. Hermkes, S. Muller, J. Schmidt, T. Colby, K. Panigrahi, G. Coupland i A. Bachmair** (2009). "Substrates Related to Chromatin and to RNA-Dependent Processes Are Modified by Arabidopsis SUMO Isoforms that Differ in a Conserved Residue with Influence on De-Sumoylation." Plant Physiol.
- Bylebyl, G. R., I. Belichenko i E. S. Johnson** (2003). "The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast." J Biol Chem **278**(45): 44113-20.
- Capili, A. D. i C. D. Lima** (2007). "Structure and analysis of a complex between SUMO and Ubc9 illustrates features of a conserved E2-Ubl interaction." J Mol Biol **369**(3): 608-18.
- Catala, R., J. Ouyang, I. A. Abreu, Y. Hu, H. Seo, X. Zhang i N. H. Chua** (2007). "The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses." Plant Cell **19**(9): 2952-66.
- Cheng, C. H., Y. H. Lo, S. S. Liang, S. C. Ti, F. M. Lin, C. H. Yeh, H. Y. Huang i T. F. Wang** (2006). "SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev **20**(15): 2067-81.
- Chosed, R., S. Mukherjee, L. M. Lois i K. Orth** (2006). "Evolution of a signalling system that incorporates both redundancy and diversity: Arabidopsis SUMOylation." Biochem J. **398**(3): 521-9.
- Clough, S. J. i A. F. Bent** (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." Plant J **16**(6): 735-43.
- Colby, T., A. Matthai, A. Boeckelmann i H. P. Stuibler** (2006). "SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from Arabidopsis." Plant Physiol. **142**(1): 318-32. Epub 2006 Aug 18.
- Conti, L., G. Price, E. O'Donnell, B. Schwessinger, P. Dominy i A. Sadanandom** (2008). "Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in Arabidopsis." Plant Cell **20**(10): 2894-908.
- David, G., M. A. Neptune i R. A. DePinho** (2002). "SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities." J Biol Chem **277**(26): 23658-63.
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez i R. T. Hay** (1998). "SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation." Mol Cell. **2**(2): 233-9.
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, G. D. Kemp i R. T. Hay** (1999). "Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1." J Biol Chem. **274**(15): 10618-24.

- Desterro, J. M., J. Thomson i R. T. Hay** (1997). "Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin." FEBS Lett **417**(3): 297-300.
- Dohmen, R. J., R. Stappen, J. P. McGrath, H. Forrova, J. Kolarov, A. Goffeau i A. Varshavsky** (1995). "An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme." J Biol Chem **270**(30): 18099-109.
- Downes, B. i R. D. Vierstra** (2005). "Post-translational regulation in plants employing a diverse set of polypeptide tags." Biochem Soc Trans **33**(Pt 2): 393-9.
- Dye, B. T. i B. A. Schulman** (2007). "Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins." Annu Rev Biophys Biomol Struct **36**: 131-50.
- Edwards, K., Johnstone, C. I C. Thompson** (1991). "A simple and rapid method for the preparations of plant genomic DNA for PCR analysis". Nucleic Acids Res. **19**(6): 1349.
- Feinberg, A. i B. Vogelstein** (1983). "A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal Biochem. **132**(1): 6-13.
- Garcia-Dominguez, M., R. March-Diaz i J. C. Reyes** (2008). "The PHD domain of plant PIAS proteins mediates sumoylation of bromodomain GTE proteins." J Biol Chem **283**(31): 21469-77.
- Geoffroy, M. C. i R. T. Hay** (2009). "An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis." Nat Rev Mol Cell Biol.
- Gill, G.** (2005). "Something about SUMO inhibits transcription." Curr Opin Genet Dev **15**(5): 536-41.
- Girdwood, D. W., M. H. Tatham i R. T. Hay** (2004). "SUMO and transcriptional regulation." Semin Cell Dev Biol **15**(2): 201-10.
- Hay, R. T.** (2007). "SUMO-specific proteases: a twist in the tail." Trends Cell Biol **17**(8): 370-6.
- Hershko, A. i A. Ciechanover** (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-79.
- Hietakangas, V., J. K. Ahlskog, A. M. Jakobsson, M. Hellesuo, N. M. Sahlberg, C. I. Holmberg, A. Mikhailov, J. J. Palvimo, L. Pirkkala i L. Sistonen** (2003). "Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1." Mol Cell Biol **23**(8): 2953-68.
- Hochstrasser, M.** (2001). "SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein." Cell **107**(1): 5-8.

- Hoegge, C., B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis i S. Jentsch** (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." *Nature* **419**(6903): 135-41.
- Hotson, A., R. Chosed, H. Shu, K. Orth i M. B. Mudgett** (2003). "Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta." *Mol Microbiol.* **50**(2): 377-89.
- Huh, W. K., J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissman i E. K. O'Shea** (2003). "Global analysis of protein localization in budding yeast." *Nature* **425**(6959): 686-91.
- Ichimura, Y., T. Kirisako, T. Takao, Y. Satomi, Y. Shimonishi, N. Ishihara, N. Mizushima, I. Tanida, E. Kominami, M. Ohsumi, et al.** (2000). "A ubiquitin-like system mediates protein lipidation." *Nature* **408**(6811): 488-92.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata i A. Kimura** (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." *J Bacteriol* **153**(1): 163-8.
- Jin, J. B., Y. H. Jin, J. Lee, K. Miura, C. Y. Yoo, W. Y. Kim, M. Van Oosten, Y. Hyun, D. E. Somers, I. Lee, et al.** (2008). "The SUMO E3 ligase, AtSIZ1, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through affects on FLC chromatin structure." *Plant J* **53**(3): 530-40.
- Johnson, E. S.** (2004). "Protein modification by SUMO." *Annu Rev Biochem* **73**: 355-82.
- Johnson, E. S. i G. Blobel** (1997). "Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p." *J Biol Chem.* **272**(43): 26799-802.
- Johnson, E. S. i G. Blobel** (1999). "Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins." *J Cell Biol* **147**(5): 981-94.
- Johnson, E. S. i A. A. Gupta** (2001). "An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins." *Cell* **106**(6): 735-44.
- Johnson, E. S., I. Schwienhorst, R. J. Dohmen i G. Blobel** (1997). "The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer." *Embo J* **16**(18): 5509-19.
- Kagey, M. H., T. A. Melhuish i D. Wotton** (2003). "The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3." *Cell* **113**(1): 127-37.
- Kahyo, T., T. Nishida i H. Yasuda** (2001). "Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53." *Mol Cell* **8**(3): 713-8.
- Kattenhorn, L. M., G. A. Korb, B. M. Kessler, E. Spooner i H. L. Ploegh** (2005). "A deubiquitinating enzyme encoded by HSV-1 belongs to a family of cysteine proteases that is conserved across the family Herpesviridae." *Mol Cell* **19**(4): 547-57.

- Kerscher, O.** (2007). "SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs." EMBO Rep **8**(6): 550-5.
- Kirsh, O., J. S. Seeler, A. Pichler, A. Gast, S. Muller, E. Miska, M. Mathieu, A. Harel-Bellan, T. Kouzarides, F. Melchior, et al.** (2002). "The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase." Embo J **21**(11): 2682-91.
- Knipscheer, P., W. J. van Dijk, J. V. Olsen, M. Mann i T. K. Sixma** (2007). "Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation." Embo J **26**(11): 2797-807.
- Kost, B., P. Spielhofer i N. H. Chua** (1998). "A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes." Plant J **16**(3): 393-401.
- Kurepa, J., J. M. Walker, J. Smalle, M. M. Gosink, S. J. Davis, T. L. Durham, D. Y. Sung i R. D. Vierstra** (2003). "The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress." J Biol Chem. **278**(9): 6862-72. Epub 2002 Dec 12.
- Leung, J. i J. Giraudat** (1998). "Abscisic Acid Signal Transduction." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. **49**: 199-222.
- Li, J., P. Nagpal, V. Vitart, T. C. McMorris i J. Chory** (1996). "A role for brassinosteroids in light-dependent development of Arabidopsis." Science **272**(5260): 398-401.
- Li, S. J. i M. Hochstrasser** (1999). "A new protease required for cell-cycle progression in yeast." Nature. **398**(6724): 246-51.
- Li, S. J. i M. Hochstrasser** (2000). "The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein." Mol Cell Biol. **20**(7): 2367-77.
- Lois, L. M. i C. D. Lima** (2005). "Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1." Embo J. **24**(3): 439-51. Epub 2005 Jan 20.
- Lois, L. M., C. D. Lima i N. H. Chua** (2003). "Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in Arabidopsis." Plant Cell. **15**(6): 1347-59.
- Mahajan, R., C. Delphin, T. Guan, L. Gerace i F. Melchior** (1997). "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2." Cell **88**(1): 97-107.
- Mahajan, R., L. Gerace i F. Melchior** (1998). "Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association." J Cell Biol **140**(2): 259-70.

- Makhnevych, T., Y. Sydorskyy, X. Xin, T. Srikumar, F. J. Vizeacoumar, S. M. Jeram, Z. Li, S. Bahr, B. J. Andrews, C. Boone, *et al.*** (2009). "Global map of SUMO function revealed by protein-protein interaction and genetic networks." Mol Cell **33**(1): 124-35.
- Mannen, H., H. M. Tseng, C. L. Cho i S. S. Li** (1996). "Cloning and expression of human homolog HSMT3 to yeast SMT3 suppressor of MIF2 mutations in a centromere protein gene." Biochem Biophys Res Commun **222**(1): 178-80.
- Matic, I., M. van Hagen, J. Schimmel, B. Macek, S. C. Ogg, M. H. Tatham, R. T. Hay, A. I. Lamond, M. Mann i A. C. Vertegaal** (2008). "In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy." Mol Cell Proteomics **7**(1): 132-44.
- Matunis, M. J., E. Coutavas i G. Blobel** (1996). "A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex." J Cell Biol. **135**(6 Pt 1): 1457-70.
- Miura, K., J. B. Jin, J. Lee, C. Y. Yoo, V. Stirm, T. Miura, E. N. Ashworth, R. A. Bressan, D. J. Yun i P. M. Hasegawa** (2007). "SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis." Plant Cell. **19**(4): 1403-14. Epub 2007 Apr 6.
- Miura, K., A. Rus, A. Sharkhuu, S. Yokoi, A. S. Karthikeyan, K. G. Raghothama, D. Baek, Y. D. Koo, J. B. Jin, R. A. Bressan, *et al.*** (2005). "The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses." Proc Natl Acad Sci U S A. **102**(21): 7760-5. Epub 2005 May 13.
- Miura, T., W. Klaus, B. Gsell, C. Miyamoto i H. Senn** (1999). "Characterization of the binding interface between ubiquitin and class I human ubiquitin-conjugating enzyme 2b by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy in solution." J Mol Biol **290**(1): 213-28.
- Mossessova, E. i C. D. Lima** (2000). "Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast." Mol Cell **5**(5): 865-76.
- Mukhopadhyay, D. i M. Dasso** (2007). "Modification in reverse: the SUMO proteases." Trends Biochem Sci **32**(6): 286-95.
- Muller, S., C. Hoege, G. Pyrowolakis i S. Jentsch** (2001). "SUMO, ubiquitin's mysterious cousin." Nat Rev Mol Cell Biol. **2**(3): 202-10.
- Murtas, G., P. H. Reeves, Y. F. Fu, I. Bancroft, C. Dean i G. Coupland** (2003). "A nuclear protease required for flowering-time regulation in Arabidopsis reduces the abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER conjugates." Plant Cell. **15**(10): 2308-19. Epub 2003 Sep 24.

- Nakaya, M., H. Tsukaya, N. Murakami i M. Kato** (2002). "Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell Physiol **43**(2): 239-44.
- Okura, T., L. Gong, T. Kamitani, T. Wada, I. Okura, C. F. Wei, H. M. Chang i E. T. Yeh** (1996). "Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin." J Immunol **157**(10): 4277-81.
- Orth, K., Z. Xu, M. B. Mudgett, Z. Q. Bao, L. E. Palmer, J. B. Bliska, W. F. Mangel, B. Staskawicz i J. E. Dixon** (2000). "Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease." Science **290**(5496): 1594-7.
- Owerbach, D., E. M. McKay, E. T. Yeh, K. H. Gabbay i K. M. Bohren** (2005). "A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation." Biochem Biophys Res Commun **337**(2): 517-20.
- Palvimo, J. J.** (2007). "PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription." Biochem Soc Trans **35**(Pt 6): 1405-8.
- Pichler, A., P. Knipscheer, E. Oberhofer, W. J. van Dijk, R. Korner, J. V. Olsen, S. Jentsch, F. Melchior i T. K. Sixma** (2005). "SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K." Nat Struct Mol Biol **12**(3): 264-9.
- Pichler, A., P. Knipscheer, H. Saitoh, T. K. Sixma i F. Melchior** (2004). "The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type." Nat Struct Mol Biol **11**(10): 984-91.
- Rabut, G. i M. Peter** (2008). "Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series." EMBO Rep **9**(10): 969-76.
- Reeves, P. H., G. Murtas, S. Dash i G. Coupland** (2002). "early in short days 4, a mutation in *Arabidopsis* that causes early flowering and reduces the mRNA abundance of the floral repressor FLC." Development **129**(23): 5349-61.
- Reverter, D. i C. D. Lima** (2005). "Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex." Nature **435**(7042): 687-92.
- Rodriguez, M. S., C. Dargemont i R. T. Hay** (2001). "SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting." J Biol Chem. **276**(16): 12654-9. Epub 2000 Dec 21.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis i H. A. Erlich** (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Saitoh, H. i J. Hinchey** (2000). "Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3." J Biol Chem. **275**(9): 6252-8.

- Sakata, E., Y. Yamaguchi, Y. Miyauchi, K. Iwai, T. Chiba, Y. Saeki, N. Matsuda, K. Tanaka i K. Kato** (2007). "Direct interactions between NEDD8 and ubiquitin E2 conjugating enzymes upregulate cullin-based E3 ligase activity." Nat Struct Mol Biol **14**(2): 167-8.
- Sambrook, J.** (2001). "Molecular cloning: A laboratory Manual".
- Saracco, S. A., M. J. Miller, J. Kurepa i R. D. Vierstra** (2007). "Genetic Analysis of Sumoylation in Arabidopsis: Heat-induced Conjugation of SUMO1 AND 2 Is Essential." Plant Physiol **20**: 20.
- Schmidt, D. i S. Muller** (2002). "Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2872-7.
- Shen, Z., P. E. Pardington-Purtymun, J. C. Comeaux, R. K. Moyzis i D. J. Chen** (1996). "UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins." Genomics **36**(2): 271-9.
- Sheng, W. i X. Liao** (2002). "Solution structure of a yeast ubiquitin-like protein Smt3: the role of structurally less defined sequences in protein-protein recognitions." Protein Sci **11**(6): 1482-91.
- Suzuki, M., Y. Kamide, N. Nagata, H. Seki, K. Ohyama, H. Kato, K. Masuda, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, et al.** (2004). "Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in Arabidopsis leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels." Plant J **37**(5): 750-61.
- Takahashi, T., A. Gasch, N. Nishizawa i N. H. Chua** (1995). "The DIMINUTO gene of Arabidopsis is involved in regulating cell elongation." Genes Dev **9**(1): 97-107.
- Takahashi, Y., T. Kahyo, E. A. Toh, H. Yasuda i Y. Kikuchi** (2001). "Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates." J Biol Chem **276**(52): 48973-7.
- Tanaka, H., P. Dhonukshe, P. B. Brewer i J. Friml** (2006). "Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development." Cell Mol Life Sci **63**(23): 2738-54.
- Tang, Z., C. M. Hecker, A. Scheschonka i H. Betz** (2008). "Protein interactions in the sumoylation cascade: lessons from X-ray structures." Febs J **275**(12): 3003-15.
- Tatham, M. H., E. Jaffray, O. A. Vaughan, J. M. Desterro, C. H. Botting, J. H. Naismith i R. T. Hay** (2001). "Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9." J Biol Chem **276**(38): 35368-74.

- Ulrich, H. D.** (2008). "The fast-growing business of SUMO chains." *Mol Cell* **32**(3): 301-5.
- Vertegaal, A. C.** (2007). "Small ubiquitin-related modifiers in chains." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 6): 1422-3.
- Vijay-Kumar, S., C. E. Bugg, K. D. Wilkinson, R. D. Vierstra, P. M. Hatfield i W. J. Cook** (1987). "Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin." *J Biol Chem* **262**(13): 6396-9.
- Watts, F. Z.** (2007). "The role of SUMO in chromosome segregation." *Chromosoma* **116**(1): 15-20.
- Windecker, H. i H. D. Ulrich** (2008). "Architecture and assembly of poly-SUMO chains on PCNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Mol Biol* **376**(1): 221-31.
- Winter, D., B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G. V. Wilson i N. J. Provart** (2007). "An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets." *PLoS ONE* **2**(1): e718.
- Wotton, D. i J. C. Merrill** (2007). "Pc2 and SUMOylation." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 6): 1401-4.
- Xu, X. M., A. Rose, S. Muthuswamy, S. Y. Jeong, S. Venkatakrisnan, Q. Zhao i I. Meier** (2007). "NUCLEAR PORE ANCHOR, the Arabidopsis homolog of Tpr/Mlp1/Mlp2/megator, is involved in mRNA export and SUMO homeostasis and affects diverse aspects of plant development." *Plant Cell* **19**(5): 1537-48.
- Yang, S. H., A. Galanis, J. Witty i A. D. Sharrocks** (2006). "An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO." *Embo J* **25**(21): 5083-93.
- Yeh, E. T.** (2009). "SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes." *J Biol Chem* **284**(13): 8223-7.
- Yoo, C. Y., K. Miura, J. B. Jin, J. Lee, H. C. Park, D. E. Salt, D. J. Yun, R. A. Bressan i P. M. Hasegawa** (2006). "SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in Arabidopsis independent of salicylic acid." *Plant Physiol.* **142**(4): 1548-58. Epub 2006 Oct 13.
- Zhang, X. D., J. Goeres, H. Zhang, T. J. Yen, A. C. Porter i M. J. Matunis** (2008). "SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis." *Mol Cell* **29**(6): 729-41.
- Zhao, X., T. Sternsdorf, T. A. Bolger, R. M. Evans i T. P. Yao** (2005). "Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications." *Mol Cell Biol* **25**(19): 8456-64.

Zimmermann, P., M. Hirsch-Hoffmann, L. Hennig i W. Gruissem (2004).
"GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox."
Plant Physiol **136**(1): 2621-32.